

최 종
연구보고서

Bacillus 유래 항염증 및 항암 물질의 탐색과
항진균 작용의 농업적 이용 연구

Studies on the antiinflammatory and anticancer
effects, and agricultural application of antifungal
effects of the molecules isolated from *Bacillus* species

성균관대학교
농업생명공학연구원

농림부

제 출 문

농 립 부 장 관 귀 하

본 보고서를 “*Bacillus* 유래 항염증 및 항암 물질의 탐색과 항진균 작용의 농업적 이용 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004 년 8 월 일

주관연구기관명 : 성균관대학교

총괄연구책임자 : 홍 성 렬

세부연구책임자 : 권 무 식

연 구 원 : 정 태 영

연 구 원 : 이 정 민

협동연구기관명 : 농업생명공학연구원

협동연구책임자 : 윤 상 흥

요 약 문

I. 제 목

Bacillus 유래 항염증 및 항암 물질의 탐색과 항진균 작용의 농업적 이용 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 과제의 협동 연구팀이 보유하고 있는 한국산 전통 젓갈에서 분리한 미생물의 산물을 예비 탐색한 결과, 선택적 항진균 작용과 강력한 iNOS 억제작용을 갖는 물질의 존재를 확인하였다. 이에 근거하여 보유하고 있는 *Bacillus*속 미생물의 여러 생리활성 물질들에서 항진균작용, iNOS 억제작용, 혈관신생 억제작용 물질을 광범위하게 탐색하여, 그 생리활성 물질의 특성 및 생리 활성 물질 생합성 유전자, 생리활성 물질의 작용 기전 등에 대한 연구를 수행하여 농업용 항진균제와 의약품으로서 항염증제와 항암제를 개발하고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

한국산 젓갈로부터 항균성을 나타내는 기능성 미생물을 분리 하였으며, 이를 동정하여 *Bacillus* 속임을 확인하였다. 분리된 *Bacillus* 속의 세균 생성물에서 선택적 항진균 작용과 신규 iNOS억제 작용과 혈관신생억제 작용을 검색하여, 유효성분을 분리하고, 그것의 제 특성과 구조분석을 시행하였다. 또한 이 물질들의 작용기전을 연구하고, 대량생산 하는데 필요한 생합성 유전자의 분리 및 생합성 효율 증진에 필요한 유전자의 분리, 유전자 전환을 이용한 유전자변형 미생물의 제조 방법 등에 대한 연구를 수행하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구를 수행한 결과, 한국산 젓갈에서 분리한 균주(JKK238)는 분자생물학적, 생화학적, 이화학적 분석에 의거 *Bacillus subtilis* 인 것으로 확인되었으며, 매우 다양한 생리활성(항진균, 항세균, 항염증) lipopeptide를 동시에 다량 생산함을 확인하였다. 이들 생리활성 물질을 분리하기 위한 생화학적, 분자생물학적 실험 과정을 통하여 lipopeptide의 신속 분

리를 위한 새로운 방법을 발견하였으며(염석법), iturin A, plipastatin, surfactin과 동등 또는 유사한 신규 화합물임을 확인하였다. 이중 기존에 항균성에 대해서만 알려져 있는 surfactin의 경우 비교적 높은 항암성, 항염증성, 신생혈관형성 억제 작용을 하는 것을 여러 생화학적 실험을 통하여 확인하였다. 또한 iturin A의 경우, 생합성 유전자군을 분리하고 유전자 염기서열을 분석하였다. 이러한 항염증, 항암, 항진균 작용을 나타내는 *Bacillus* 균주의 생리활성 생합성 기능을 향상시키고자, 균주로부터 quorum sensing 및 생리활성 물질 합성에 관여하는 중요한 인자의 유전자를 분리하였으며, 이를 형질전환하여, 기능이 향상된 형질전환 미생물을 제작하고자 하였다. 이러한 연구는 한국산 것갈에서 유용한 물질을 생산하는 균주의 분리와 이의 생성물의 항염증 효과 검색, 항암효과인 혈관신생억제 작용과 암세포 특이적 세포독성, 세포주기 저해 및 세포자살 관련성을 규명하여 항염증, 항암, 항균 물질을 개발하는데 기여할 것이다.

SUMMARY

(영문요약문)

1. Title

Studies on the antiinflammatory and anticancer effects, and agricultural application of antifungal effects of the molecules isolated from *Bacillus* species

2. Backgrounds and purposes

In previous studies, a bacteria (JKK238) showing inhibitory effects on the bacterial and fungal growth, and nitric oxide production was screened and selected from traditional fermentation products. Antibacterial and antifungal properties, anti-iNOS activity involved in antiinflammatory effects, and anticancer effects of JKK238 has been tested.

3. Results and discussion

Bacteria JKK238 strain was identified as a *Bacillus subtilis* by morphological, biochemical, and molecular evidences. JKK238 strain has strong inhibitory effects on broad spectra of bacteria and fungi because of lipopolypeptides produced in stationary growth. The lipopeptides were identified by structural analysis using MALDI-TOF MS and NMR. The lipopolypeptides produced by the strain has also high level of inhibitory effects against NO production by Griess assay on RAW 264.7 cell line and the cancer cell proliferation in dose-dependent manner. The results of the tube formation assay, CAM assay, and RT-PCR involved in angiogenic factors revealed that the lipopeptide, especially known as surfactin, has antiangiogenic property. To control the lipopeptide production by gene manipulation, construction of genomic Fosmid library, screening and gene cloning for iturin A lipopeptide, and construction of Tn mutants for the screening of lipopeptide- biosynthetic genes were performed. The genes involved in quorum sensing (ComA, ComP, ComQ, ComX), and secondary metabolite production (SigW, AbrB) were isolated. Transformation into the strain has been attempted. These results will be helpful to develop the novel material(s) used in agricultural or/and medical applications.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Description for submission	1
Summary	2
Summary in English	4
Contents in English	5
Contents	6
Part 1. Introduction	7
1. Backgrounds	7
2. Purposes	8
Part 2. Present status of the techniques	10
1. Domestic trends in the research field	10
2. Foreign trends in the research field	10
3. <i>Bacillus</i> and Quorum Sensing	11
Part 3. Methods and Results	13
1. Research Part 1	13
2. Research Part 2	42
3. Research Part 3	69
Part 4. Evaluation	105
1. Annual evaluation	105
2. Achievement	107
Part 5. Practical use and application	110
1. Practical use	110
2. Applications	111
3. Publication	111
Part 6. References	114

목 차

제출문	1
요약문	2
영문요약문	4
영문목차	5
목차	6
제1장 연구개발과제의 개요	7
제1절 연구개발의 필요성	7
제2절 연구개발의 목표 및 내용	8
제2장 국내외 기술개발 현황	10
제1절 국내 기술 개발 현황 및 개발 수준	10
제2절 외국 기술 개발 현황 및 수준	10
제3절 <i>Bacillus</i> 균주와 Quorum Sensing	11
제3장 연구개발 수행 내용 및 결과	13
제1절 제1세부과제	13
제2절 제2세부과제	42
제3절 협동과제	69
제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	105
제1절 연구개발 목표 및 평가 착안점	105
제2절 연차별 연구개발 목표 달성도	107
제5장 연구개발결과의 활용계획	110
제1절 연구성과	110
제2절 활용계획	111
제3절 연구 성과 발표	111
제6장 참고문헌	114

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

- 과거 20여 년간의 노력에 의하여 우리나라도 유전공학적 방법을 충분히 축적하였다. 그러나, 이러한 방법을 적용할 목적 **신물질의 개발은 저조하다.**
- 최근에 국내 고유 미생물자원의 분리작업이 활발하게 진행되어 많은 종류의 **미생물자원이 확보**되었으나, 이의 산물의 **효력과 작용기전에 관한 연구가 한정**되었다.
- 이러한 미생물 자원으로부터 **새로운 기능의 생리활성물질의 개발**을 통한 생명공학 원천 소재 확보가 절실히 요구된다.
- 이를 위하여 새로운 기능과 효력을 갖는 **선도물질의 탐색기술이 필요하다.**
- 탐색에 의해 선발된 생리활성물질의 다양한 기능과 기전해석을 통한 물질과 이의 산업적 및 농업적 이용에 관한 기술정보의 **선점이 필요하다.**
- Nitric oxide (NO)는 생체 내에서 세포독성, 혈관확장, 신경전달 등의 중요한 기능을 나타낸다. Nitric oxide를 합성하는 효소인 nitric oxide synthase(NOS) 중 inducible NOS (iNOS)에 의해 생성된 과량의 NO가 염증반응을 유도한다는 새로운 결과가 발표되었다. 최근 iNOS의 **저해제가 관절염등의 염증성 질환의 치료에 이용**될 수 있다는 사실이 알려진 후, iNOS 저해제의 합성과 탐색연구가 활발히 진행중이다.
- 국내에서도 약용식물에서 iNOS 저해제의 탐색이 진행 중에 있다. 그러나, **고유 미생물 유래의 iNOS 억제 물질을 탐색하는 연구는 시도된 바가 거의 없다.**
- NO synthesis를 촉매하는 NOS와 NOS signaling pathway는 항염증제 개발에 있어서 매우 중요한 target으로 다기능 펩타이드의 새로운 기전에 의한 **선택적 항염증제 개발**로의 가능성을 제공한다.
- **혈관신생억제작용**은 최근 새로운 **항암치료의 방법**으로 부각되고 있으며, 본 연구실에서 시행하고 있는 유정란을 이용한 chorioallantoic membrane (CAM) assay 기술과 지표 유전자의 발현억제양상의 관찰에 의해 **혈관신생억제기능이 있는 새로운 물질을 탐색**할 수 있다.
- **항진균 물질**은 농산물을 포함한 식품의 **방부제 또는 보존제**로서 안전성 확보된 물질 개발이 필요하다.
- 본 연구에서 확립된 항진균, 항염증 물질, 혈관신생억제물질의 활성 검색 시스템은 앞으로 다른 속의 미생물 유래 항염증 물질, 혈관신생 억제물질의 검색 시스템으로도 직접 응용이 가능하게 된다.
- 선발된 물질의 합성 유전자를 **다른 미생물이나 식물에 이식하여 대량생산도 시도**할 예

정이다.

- 산업적으로 매우 유용한 그람양성 세균의 기능 유전자 추적 및 분리와 그 기능 분석을 위한 **transposon system**의 기술 개발 확립과 확대가 시급하다.
- 국내 고유 미생물 자원에서 유래된 생리활성 펩타이드 생합성 유전자는 그 신규 가능성을 제고하고 **원천 분자 육종 소재**의 제공에 기여할 것이다.

2. 경제·산업적 측면

- 본 연구를 통하여 개발된 *Bacillus*속 유래 생리활성물질을 분리, 정제 하는 기술은 **미생물로부터 항생물질이외의 새로운 물질의 탐색에 응용이 가능하여 식품 및 의약산업에의 파급효과**가 기대된다.
- 화학적 합성과 식물성분에만 의존하던 iNOS 활성저해제와 혈관신생저해제의 개발을 미생물유래의 생리활성물질의 개발에 적용함으로써 **독점적 신물질의 확보**를 가능하게 하고, **파급효과를 극대화** 할 수 있는 계기가 될 것이다.
- 고유 유전자 조작을 통한 신규 기능 물질 창출은 **국제 경쟁성을 높여주고 다양한 산업의 실질적 응용**으로 확대되어 궁극적으로 시장 확대에 기여함으로써 국가의 부 창출에 기여할 것이다.

3. 사회·문화적 측면

- 외국에 의존적이던 기존의 항염증, 항암물질에 대신하여 국내 고유의 미생물유래 신물질이 개발된다면 식품, 의약제의 국산화에 기여하게 되어 국내 생명공학계에 대한 인식이 개선될 것임.

제 2 절 연구개발의 목표 및 내용

1. 연구목표

본 과제외의 협동 연구팀이 보유하고 있는 한국산 진통 짓갈에서 분리한 *Bacillus*속 미생물의 산물을 예비 탐색한 결과, 선택적 항진균 작용과 강력한 iNOS 억제작용을 갖는 물질의 존재를 확인하였다(참조: **선행연구결과**). 이에 근거하여 보유하고 있는 *Bacillus*속 미생물의 산물들에서 항진균작용, iNOS 억제작용, 혈관신생 억제작용 물질을 광범위하게 탐색하여 **농업용 항진균제와 의약품으로서 항염증제와 항암제**를 개발하고자 한다.

2. 연구내용

고유 *Bacillus*속의 세균 생성물에서 선택적 항진균 작용과 신규 iNOS억제 작용과 혈관신생억제 작용을 검색하여, 유효성분을 분리하고, 그것의 제 특성과 구조분석을 시행한다. 또한 이 물질들의 작용기전을 연구하고, 대량생산을 위하여 유전자변형 미생물과 식물의 제조방법을 고안한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 기술 개발 현황 및 개발 수준

- 한국고유 동, 식물 및 곤충자원에서부터 신규 항균펩타이드 탐색과 안정적 발현연구가 진행중임
- 곰팡이로부터 항진균 펩타이드의 분리, 항균펩타이드의 합성연구를 수행중임
- 국내에서는 현재까지 미생물유래 약효 물질이 상업화에 성공하지 못함.
- 국내의 유전자 발현 연구는 주로 기지 단백질이나 효소의 유전자 클로닝이나 조작에 치우치고 있으며, 다양한 생리활성을 가진 이차 대사산물 생합성 유전자군의 분석과 발현 연구는 매우 미흡하고, 그 관련 기술 수준도 낮다.
- 미생물이 생산하는 생리 활성 물질은 매우 다양하며, 그 대부분이 이차대사 산물이므로 이들의 신규 기능 유전자를 추적, 분리하기 위해서는 대상 기능이 상실되거나 감소된 Tn 돌연변이주의 확보가 필수적이나, 그람양성균의 경우 이에 연관한 벡터나 기술 확립이 국내에서는 미비하다. 따라서 고유의 미생물 자원에서 신규성이 유력한 이차대사 산물이 발견되더라도 이것의 생합성에 관여하는 유전자를 분리하고 그 기능을 단 시간 내에 효율적으로 밝혀내지 못함으로써 고유 유전자의 확보에 지장을 초래하고 있음.

제 2 절 외국 기술 개발 현황 및 수준

- 생물 유래 신물질 중 항균 펩타이드의 탐색은 1980년대부터 활발히 수행되어 다양한 생명체로부터 150여종 이상이 분리되어 있고, 최근엔 펩타이드 공학기술로서 천연 항균펩타이드의 구조를 기본으로 한 기능향상과 변환이 이루어진 신규 펩타이드 유도체들이 개발되고 있음.
- 동식물 유래 신물질의 항생제 기능 외에 항암, 항염증 효과 등에 대한 기능탐색과 기전연구 결과의 산업적 응용을 활발히 전개되고 있으나, 미생물 유래물질의 신물질의 발견과 개발은 활발하지 못함.
- 이미 선진 외국에서는 다양한 Tn system을 개발하고 이것을 다양한 미생물에 적용하여 고부가 생리활성을 지닌 이차대사 산물 생합성 유전자를 분리, 조작하여 이들의 발현 증진이나 신규 기능의 물질을 인위적으로 창출하는 단계에 있음.

제 3 절 *Bacillus* 군주와 Quorum Sensing

*Bacillus*는 호기성이며 그람 양성균에 속한다. 토양, 특히 식물 주위에 토양에서 쉽게 발견되고 동정될 수 있으며, sporulation이라는 일반 박테리아에서는 발견되지 않은 특이한 life cycle을 부가적으로 가진다. 이러한 *Bacillus*를 포함한 박테리아 종은 환경적 요인에 따른 여러 가지 생존방식을 가진다. 이동을 한다든지, 특정한 항생물질을 생산해 낸다든지, 개체수를 조절한다든지 하는 것이 박테리아가 가지는 대표적인 생존 방식이다. 이들 중 대부분은 정족수 반응(Quorum sensing, QS)이라고 하는 복잡한 신호 전달 체계로 조절된다 (Figure 1)

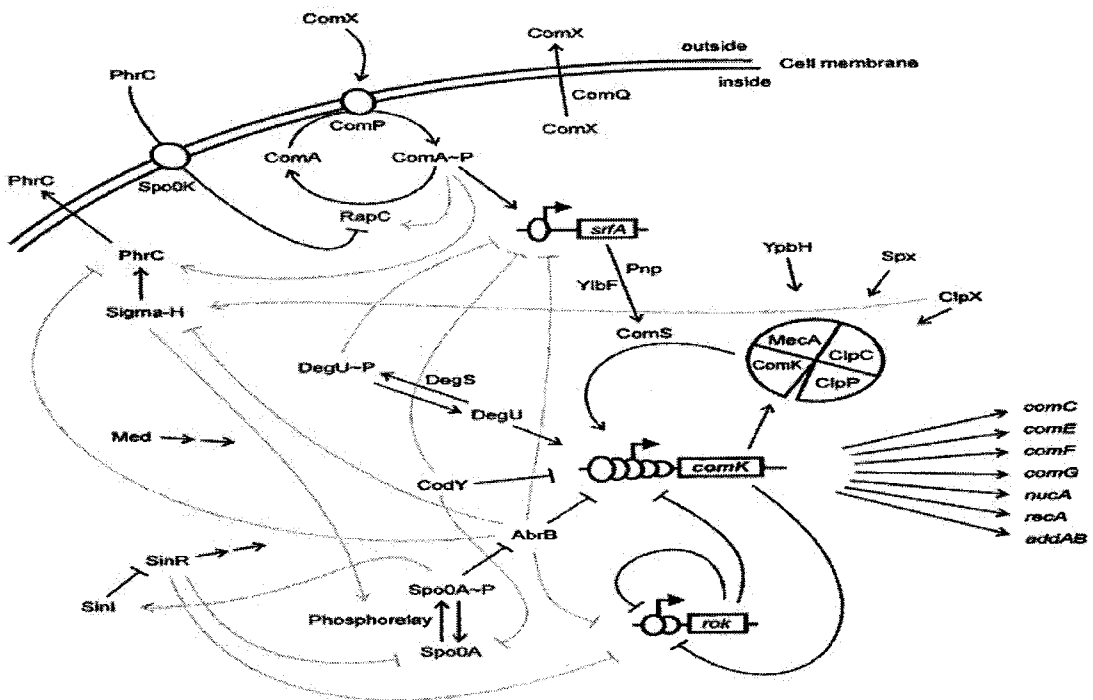


Figure 1. Overview of the regulation pathways related to quorum sensing.

이러한 신호 전달 체계는 상황에 맞는 적절한 조치를 취하게 해주는데, 이러한 신호 전달로 공생, 병원성, 수용능, 항생제 생성, 이동성, 점액질 물질 형성 그리고 포자형성 등과 같은 형태적, 기능적인 특성이 나타난다. 그리하여, 이러한 반응들을 QS 반응이라고 일컫는다. 이러한 반응을 일으키기 위하여 *Bacillus* 종은 외부로 펩타이드 신호 물질을 내어놓는데, 이것은 종내 같은 세포간에 유전자의 발현을 변화시키는 데 작용하는 것으로 알려졌다. 이 물질을 일반적으로 ComX라고 하며, autoinducer, extra-cellular pheromone 이라고 부르기도 한다. 이 물질은 *Bacillus*종에서 개체수의 농도에 연관되어 유전자 발현의 변화를 조절한다.

ComX는 관련 유전자의 군집인 QS 유전자들에 의해 외부로 배출되는데, 그 유전자들로는 comQ, comP, comA 등이 있다. ComQ의 기능은 정확히 알려지지 않고 있으나, ComX의 생성을 위하여서는 꼭 필요한 것으로 알려져 있으며, ComP와 ComA는 조절 단백질로서 작용하는데, 각각의 기능은 histidine kinase와 transcription factor로 알려져 있다. 거기에 더해 다른 유전자 혹은 유전자 산물들도 QS 반응에 관련이 있다고 생각되는데, 대표적인 것으로서 AbrB, SigW가 있다. AbrB는 *Bacillus*의 생장 곡선의 단계중 대수기에서 정지기로 넘어갈 때 발현되는 많은 유전자들을 억제하는 기능을 가진 단백질로 알려져 있다. SigW는 항생물질을 암호화 하고 있는 유전자들과 관계있는 RNA 합성효소의 sigma factor이다. 이러한 QS 반응과 관련하고 있는 유전자의 발현간의 상호관계 혹은 조절을 연구하기 위하여, *Bacillus subtilis*의 strain인 JKK238 균주를 동정해 내었으며, 각각의 유전자들을 분리해 내었다. 이러한 유전자들의 분리와 그것의 발현간의 상호관계 혹은 조절을 연구함으로써 *Bacillus subtilis* strain JKK238 균주에 있어 대사의 조절을 기대할 수 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 세부과제 :

Bacillus 생리활성 물질의 특성 규명 및 생리 활성 탐색
(성균관대학교 유전공학과 홍성렬)

1. 연구 수행 방법

가. 신기능펩타이드의 분자량 결정

1) SDS-PAGE를 이용한 분자량 결정

정제된 신기능펩타이드를 5×SDS sample buffer를 넣어 5분간 100℃ 끓는 물에서 가열한 뒤 5-20 % polyacrylamide gel electrophoresis를 수행한다. Coomassie blue염색법으로 염색한 후 destaining하여 band의 위치를 확인하고 분자량을 추정하였다.

2) Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS)

신기능펩타이드를 MALDI-MS matrix인 3-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA)를 이용하여 분자량을 측정하였다.

나. 항염증작용 탐색

1) 세포 배양

Mouse macrophage like cell line, RAW 264.7과 ras-NIH3T3, NIH-3T3는 10% FBS가 포함된 DMEM을, LOVO, HT-29, Hela, MCF-3는 10% FBS가 포함된 RPMI 1640을 5% CO₂, 37 °C incubator 에서 배양했다.

2) 세포 독성 효과

세포 독성은 MTT assay(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods, 65, 55-63,1983)를 사용하여 분석하였다. 96-well cell culture plate에 5×10^4 의 세포를 plating하고 37℃에서 24 시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 96-well plate에 50 μ l MTT solution (stock concentration : 0.5 mg/ml)를 첨가하여 4시간동안 37℃에서 반응을 시켰다. 각 well에 100 μ l

dimethyl sulfoxide (DMSO)와 20 μ l Sorenson's solution (0.1 M glycine, 0.1 M NaCl, pH 10.2)를 첨가하여 formazan crystal을 용해시켰다. 세포 내에서 MTT가 formazan으로 reduction된 양을 540 nm의 흡광도를 이용하여 측정한다. 생존율은 물질을 처리하지 않은 세포의 흡광도 값의 백분율로 계산을 하며 세포 독성은 대조군과 per cent survival의 차이로 나타내었다.

3) Nitrite/nitrate 의 정량

Macrophage내의 NOS에 의해 L-arginine으로부터 생성된 NO의 산화물인 nitrite(NO_2^-)와 nitrate(NO_3^-)는 macrophage로부터 유리된다. 이 유리된 nitrite와 nitrate를 정량함으로서 NOS 활성도를 간접적으로 측정한다. 먼저 nitrate를 nitrate reductase를 사용하여 nitrite로 전환시킨 후 총 nitrite양을 Griess reagent를 가해 비색 정량했다. 일정량의 cell medium, 56 mM KH_2PO_4 (pH 7.4), 2.5 μ M FAD, 100 μ M NADPH, Nitrate reductase 0.1 unit를 포함하여 total incubation mixture를 1,000 μ l로 하고, 37 $^\circ$ C 에서 20분간 incubation한 후 sodium pyruvate 10 mM, lactate dehydrogenase 10 mg/ml를 포함하는 buffer 250 μ l를 가한 후 5분간 incubation하며, 반응은 deproteinizing agent (0.42 M zinc sulfate in 0.5 M NaOH) 250 μ l를 가한 후, 4 $^\circ$ C ice에서 10분간 방치함으로써 종결되었다. 이어서 11,000 \times g에서 10분간 원심분리한 후 supernatant 500 μ l를 Griess reagent (0.5% naphthylethylene-diamine dihydrochloride, 5% sulfanilamide, 25% H_3PO_4) 1000 μ l에 가한 후 20분 동안 방치하고, 540nm에서 흡광도를 측정했다. Standard solution은 NaNO_2 160 μ M을 희석하여 사용했다. iNOS의 활성억제 검색은 24-well plate에 세포를 분주한 뒤, LPS (100 ng/ml)과 IFN- γ (10 U/ml)의 iNOS 유도물질과 시료(항균펩타이드)를 처리하여 18시간 배양한 상층액을 취하고, 여기에 Griess reagent 를 가해 섞어준 다음 상온에서 10분 동안 반응시켜 540 nm에서 흡광도를 측정했다. 표준물질로 sodium nitrite (5 에서 50 μ M)를 사용하여 검량선을 작성했다.

4) RT (Reverse Transcriptase) PCR

세포에 surfactin 또는 Bacitracin 을 농도 별로 처리한 후 세포를 trypsin/EDTA를 이용하여 분리하였다. Total RNA는 easy-BlueTM extraction kit (Intron, USA)을 사용하여 분리하였다. RNA의 농도를 일정하게 맞춘 후, 37 $^\circ$ C 에서 1시간 반응시켜 cDNA를 생성한 후 제작한 primer로 PCR을 수행하였다.

iNOS sense 5'-AGTTTCTCTTCAAAGTTCAAATCCTA-3'
 antisense 5'-ATTTCTATTTTCCTTTGTTACAGCTT-3'

COX-2 sense 5'-AAATACCAGTCTCTCAATGAGTACC-3'
 antisense 5'-TGTAGGGTTAATGTCATCTAGTCTG-3'

Angiopoietin 1	sense 5'-CCATTCTGACTCACATAGGG-3' antisense 5'-GGTCTCAACA TCTGTCAGCT-3'
Angiopoietin 2	sense 5'-ATCAGGCCTACTGTGACAT -3' antisense 5'-ATCATCATGGTTGTGGCCTT-3'
p21	sense 5'-ATGGAACTTCGACTTTGTCACC-3' antisense 5'-GGTAGAAATCTGTCATGCTGGTC-3'
CyclinE	sense 5'-CACAGGGAGACCTTTTACTTGG-3' antisense 5'-CTGATACCCTGAAACCTTTTGC-3'
CDK2	sense 5'-TTCTGCACCAAGATCTCAAGAA-3' antisense 5'-GGGAAACTTGGCTTGTAATCAG-3'
GAPDH	sense 5'-GCCATCAACGACCCCTTCATTGAC-3' antisense 5'-CACGGAAGGCCATGCCAGTGAGCTT-3'

PCR은 Premix (Super-Bio. Co., Seoul)를 이용하여 수행하였으며, PCR의 총 반응액은 20 μ l로 하여 1 μ l의 cDNA, 1 μ l 각 10 pmole의 primer, 10 μ l의 premix, 7 μ l의 D.W를 혼합하였다. 먼저 95°C에서 3분간 주형 DNA를 변성시킨 후 94°C 30초, 57~60°C 30초, 72°C 30초의 반응 사이클을 25~30회 반복 시행하였다.

5) Rat paw edema test

랫드의 오른쪽 뒷발의 발목 관절부위를 유성펜으로 표시한 후 plethysmometer를 사용하여 발의 부피를 측정했다. bacitracin(25 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg), bacillus culture를 복강 투여 경로로 투여 후 30분 후에 생리 식염수에 녹여 제조한 1% carrageenan을 rat의 뒷발에 0.1ml/paw 용량으로 피하주사했다. 일정 시간 후 일정 시간 간격으로 부종 정도를 측정하여 부종 증가율 및 부종 억제율을 측정하여 대조군과 비교했다.

다. 항암작용 탐색

1) 신생혈관형성(angiogenesis) 억제효과의 검색

수정된 유정란의 표면을 70% 에탄올로 닦아준 후 37°C에서 3.5일 동안 incubation한다. 3.5일후 유정란의 알부민을 3ml 추출한후 window를 내고 4.5일이 되는날 시료를 농도별로 chorioallantoic membrane (CAM)에 처리한다. 6.5일이 되는날 유정란의 CAM에 intralipose를 채워 맥관형성을 관찰함으로써 시료가 맥관 형성에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

2) Tube Formation

Surfactin의 anti-angiogenic effect를 알아보기 위해 *in vitro*에서 matrigel이 코팅된 plates에 HUVECs을 키운 후 capillary같은 구조 형성이 이루어지는지의 여부에 대한 실험이다. Human Endothelial Cells 을 matrigel이 코팅된 96 well plate 에 키운 후, surfactin을 5 uM 처리하고 12시간 동안 반응시킨 후 관찰하였다.

3) 암세포에 대한 세포 주기 측정

1×10^6 으로 키운 대장암 세포인 LOVO 에 surfactin을 30 uM 로 24시간 처리한 후 trypsin/EDTA를 이용하여 분리한 후, $700 \times g$ 에서 3분 동안 원심분리하고 DPBS로 2번 세척했다. 세포를 $200\mu\text{l}$ 의 DPBS로 현탁하여 70 %의 차가운 에탄올을 첨가하여 한 시간동안 얼음에 방치하였다. 원심분리로 에탄올은 제거한 후 $800 \mu\text{l}$ 의 DPBS로 현탁하여 26G1/2크기의 바늘로 주사기에 통과시켜 세포와 세포를 분리하였다. 1 mg/ml 의 RNaseA $100\mu\text{l}$ 를 첨가하여 37 °C에서 30분간 반응시킨 후 propidium iodide (PI)를 40 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 첨가한다. 반응이 끝난 세포들을 FACSCalibur flow cytometer(Becton Dickinson)로 분석하였다.

4) Annexin V assay

LOVO cell을 6-well에 confluent 하게 키운 후, surfactin을 30uM 처리하여 cell 을 모은 후 BD Pharmigen™ Annexin V-FITC Apoptosis Kit (556547)로 staining 한 후, flow cytometry로 apoptosis의 양상을 관찰하였다.

5) Apoptosis 현상을 관찰하기 위한 DNA Fragmentation Assay

LOVO cell을 6-well에 confluent 하게 키운 후, surfactin을 15, 30 uM 로 처리하여 LaboPass™ Genomic DNA Isolation Kit을 이용하여 Genomic DNA를 분리하였다. 분리된 Genomic DNA를 정량한 후, 1.8 % agarose gel 에 50v로 전기영동하였다.

6) Western Blotting

LOVO cell을 6-well에 confluent하게 키운 후, surfactin을 15, 30 uM 로 처리하여 Pre-PRO™ protein extraction kit (Intron)으로 단백질을 분리하였다. Bradford assay로 단백질을 정량한 후, SDS-PAGE 를 통해 크기별로 분리하였다. 메탄올에 의해 활성화 된 membrane에 단백질을 1시간동안 Eletroblotting을 한 후, 5 % skim milk in TBST로 Blocking을 1시간 수행하였다. 1차항체를 붙인 후, washing을 하고, 2차항체를 50분 동안 붙인 다음 washing을 하였다. ECL Plus Western Blotting detection kit (Amersham Bioscience, USA)을 사용해 필름으로 현상하였다. p21 (Santa Cruz, USA), PARP (Pharmigen, USA), caspase 3 (Cell signaling, USA)에 대한 특이항체를 사용하였다.

2. 연구 결과

가. JKK238균주의 배양액으로부터 얻은 물질의 NOS억제력 탐색

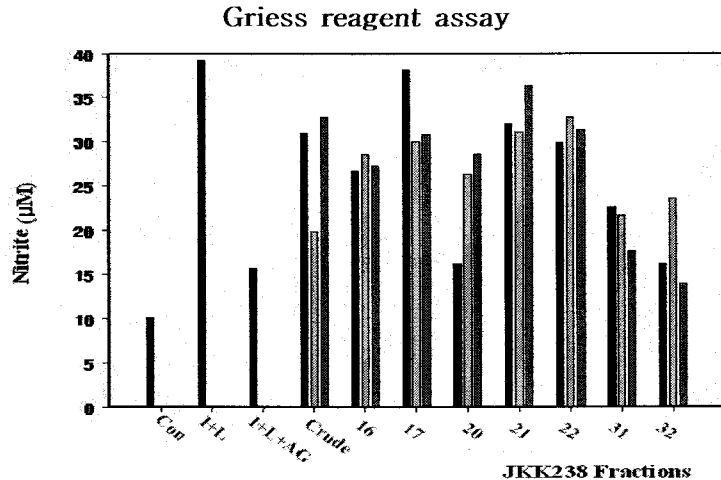


Figure 1-1. JKK238의 배양액에서 추출 및 C18 reverse phase chromatography로 분리한 물질(fraction #16, 17, 20, 21, 22, 31, 32)을 LPS와 IFN- γ 로 iNOS를 induction시킨 RAW264.7에 처리하여 Griess reagent assay를 한 결과 #16, #17, #21은 30%의 NO생성 저해 효과가 있었으며 #20, #31, #32는 50%의 NO생성 저해효과가 있었다.

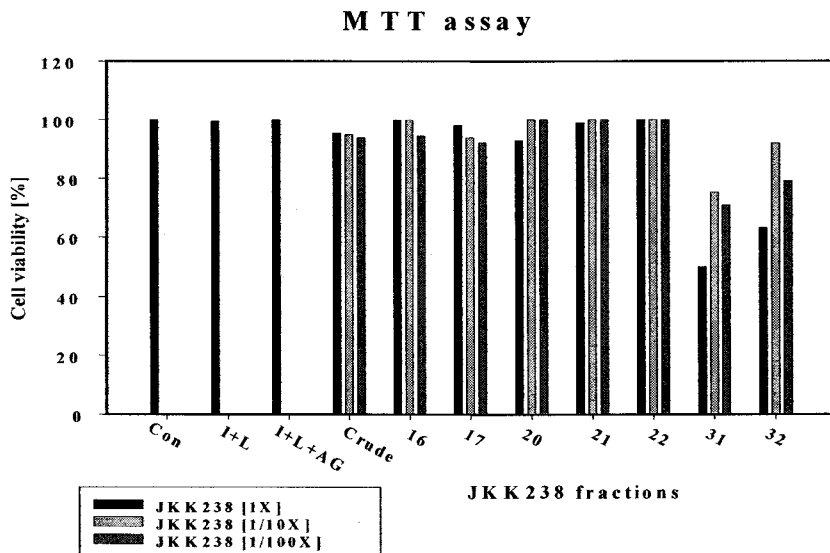


Figure 1-2. #31, #32의 1X농도를 처리한 세포가 50%정도의 세포독성이 있었으며 1/10X, 1/100X는 각각 70-80%의 viability를 나타내었다. 분획 #16, 17, 20, 21, 22는 세포의 viability에 영향을 거의 주지 않은 것으로 보아 세포독성이 없음을 나타내었다.

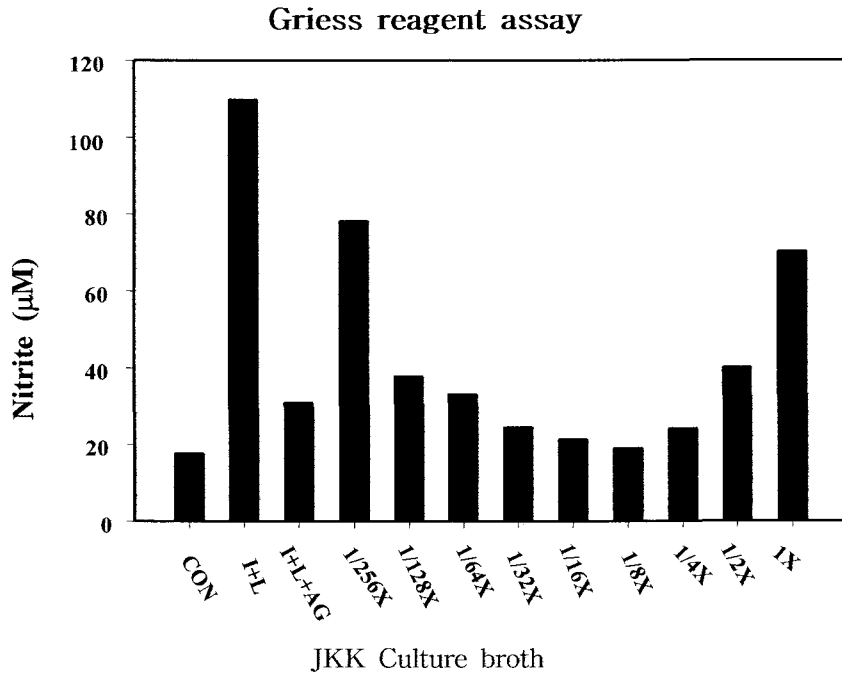


Figure 1-3. JKK238 배양액을 80% ammonium sulfate로 농축시킨 다음 centriprep을 이용하여 salt를 제거한 sample을 serial dilution을 시켜서(1X, 1/2X, 1/4X, 1/8X, 1/16X, 1/32X, 1/64X, 1/128X, 1/256X) LPS와 IFN- γ 로 iNOS를 induction시킨 RAW264.7 cell에 처리하여 Griess reagent assay를 한 결과 dose-dependent하게 NO production이 감소하는 것을 볼 수 있었다. 세포독성이 거의 없는 80% ASP JKK238배양액 1/16X가 80%정도의 NO Production을 inhibition함을 볼 수 있었다.

MTT Assay

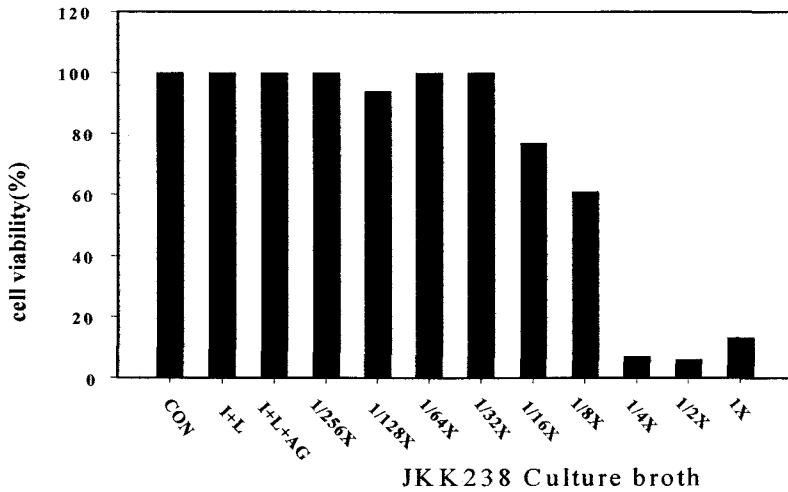


Figure 1-4. 1X, 1/2X, 1/4X 농도를 처리한 세포가 90%정도의 세포독성이 있었으며 1/8X, 1/16X는 각각 70-80%의 viability를 나타내었다. 1/32X, 1/64X, 1/128X는 세포의 viability에 영향을 거의 주지 않은 것으로 보아 세포독성이 없음을 나타내었다.

Griess Reagent Assay

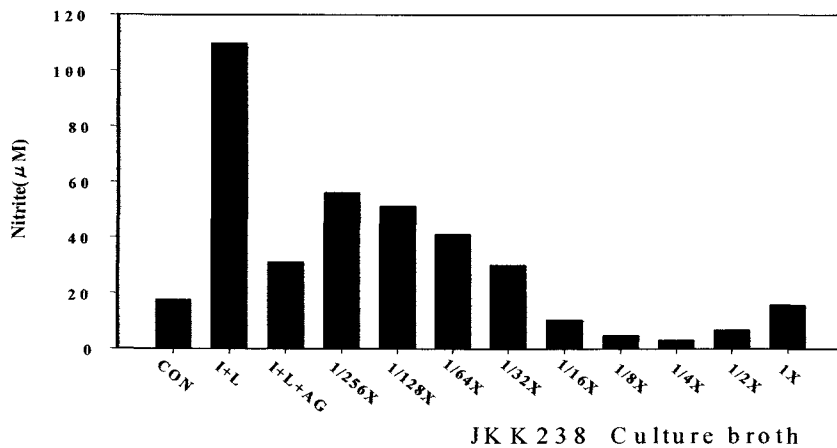


Figure 1-5. JKK238의 배양액을 30% ammonium sulfate로 농축시킨 다음 centrprep을 이용하여 salt를 제거한 sample을 serial dilution을 시켜서(1X, 1/2X, 1/4X, 1/8X, 1/16X, 1/32X, 1/64X, 1/128X, 1/256X) LPS와 IFN- γ 로 iNOS를 induction시킨 RAW264.7 cell에 처리하여 Griess reagent assay를 한 결과 dose-dependent하게 NO production이 감소하는 것을 볼 수 있었다. 세포독성이 거의 없는 30% ASP JKK238배양액 1/16X가 90%정도의 NO Production

을 inhibition함을 볼 수 있었다.

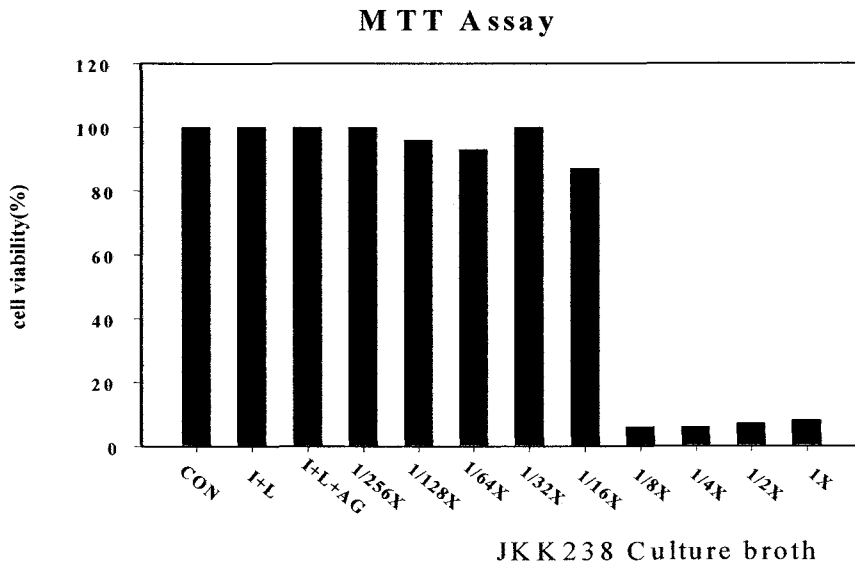


Figure 1-6. 1X, 1/2X, 1/4X, 1/8X농도를 처리한 세포가 90%정도의 세포독성이 있었으며 내었다. 1/16X, 1/32X, 1/64X, 1/128X는 세포의 viability에 영향을 거의 주지 않은 것으로 보아 세포독성이 없음을 나타내었다

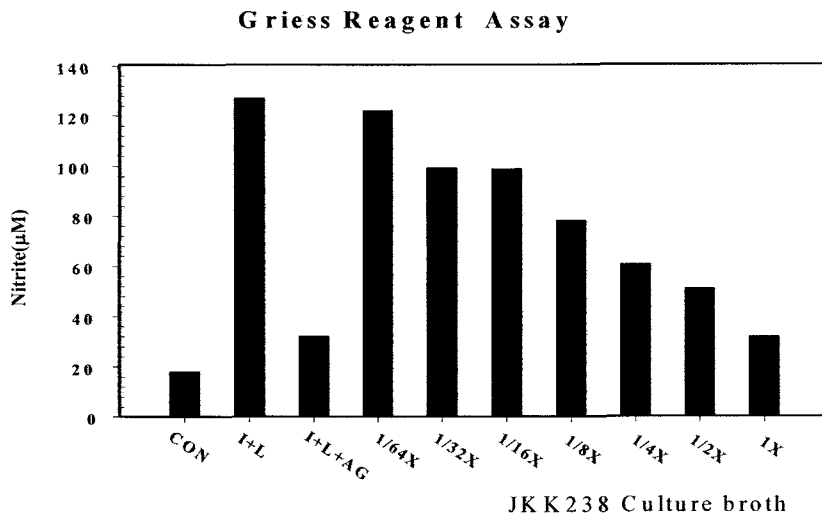


Figure 1-7. JKK238의 배양액을 자체를 LPS와 IFN- γ 로 iNOS를 induction시킨 RAW264.7 cell에 처리하여 Griess reagent assay를 한 결과 dose-dependent하게 NO production이 감소하는 것을 볼 수 있었다. 세포독성이 없는 1/2X가 60%의 NO 생성저해 효과가 있음을 알 수 있었다.

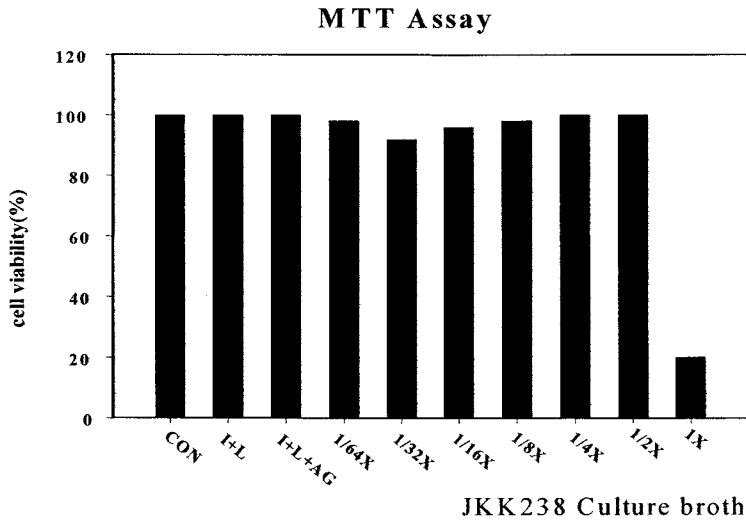


Figure 1-8. 1X 농도를 처리한 세포가 80%정도의 세포독성이 있었으며 1/2X부터는 세포의 viability에 영향을 거의 주지 않은 것으로 보아 세포독성이 없음을 나타내었다

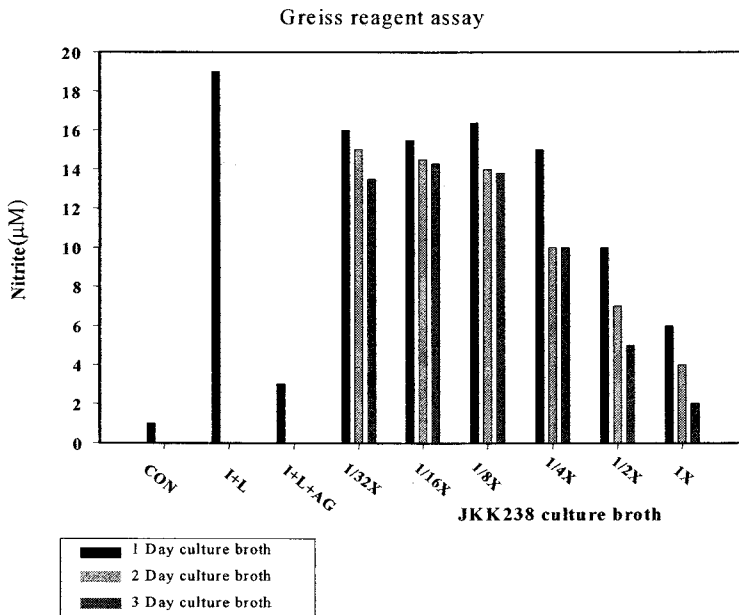


Figure 1-9. JKK238을 1day, 2 day, 3day로 나누어서 날짜별로 배양한 배지 자체를 LPS와 IFN- γ 로 iNOS를 induction시킨 RAW264.7 cell에 처리하여 Griess reagent assay를 한 결과 1 Day culture broth보다 2 day culture broth와 3day culture broth가 NO production 저해효과가 더 크다는 것을 알 수 있었다. 그리고 세포독성이 없는 1/2X에서만 3 day culture broth가 2 day culture broth보다 NO production 저해효과가 더 크고 나머지 1/4X, 1/8X, 1/16X, 1/32X에서는 별다른 차이가 없음을 알 수 있었다.

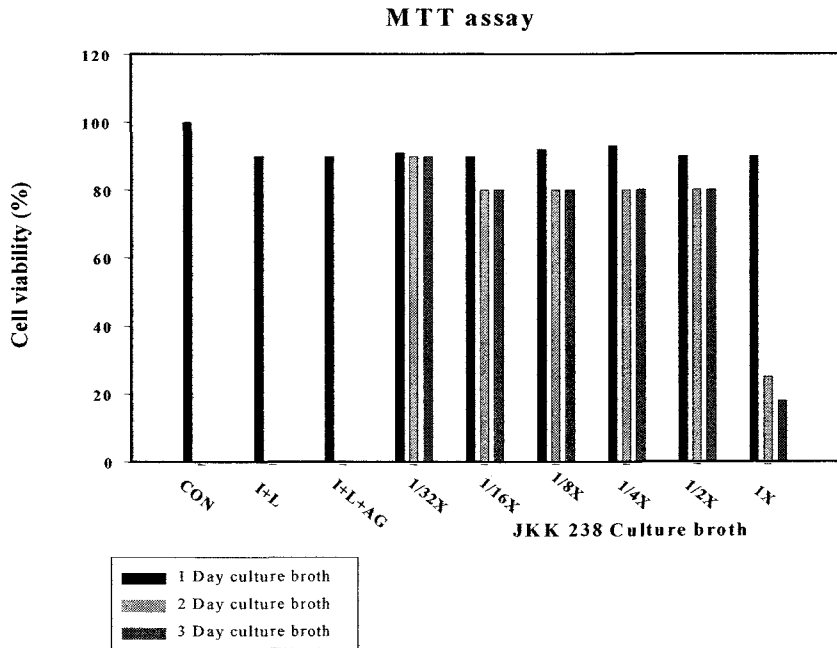


Figure 1-10. JKK238을 1day, 2 day, 3day로 나누어서 날짜별로 배양한 배지 자체를 LPS와 IFN- γ 로 iNOS를 induction시킨 RAW264.7 cell에 처리하여 MTT assay를 한 결과 1 Day culture broth는 모든 농도에서 세포독성효과가 없음을 알 수 있었고 2 day culture broth와 3day culture broth는 모두 1X에서 80%의 세포독성효과가 있음을 알 수 있었다.

나. 신생혈관형성(angiogenesis) 억제효과의 검색

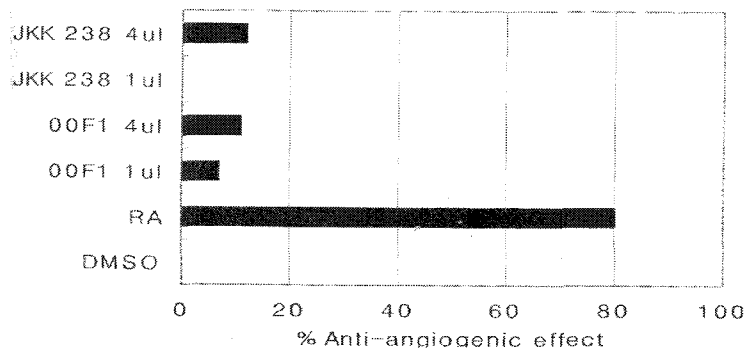


Figure 1-11. CAM Assay에 의해서 JKK238의 Anti-angiogenic effect를 측정 한 결과 positive control인 RA(Retinoic acid)가 80%의 Anti-angiogenic effect를 나타낸 반면 JKK238을 처리했을 때는 20%정도로 Anti-angiogenic effect가 비교적 적은 것으로 나타났다.

다. 암세포에 대한 세포독성(cytotoxicity) 효과

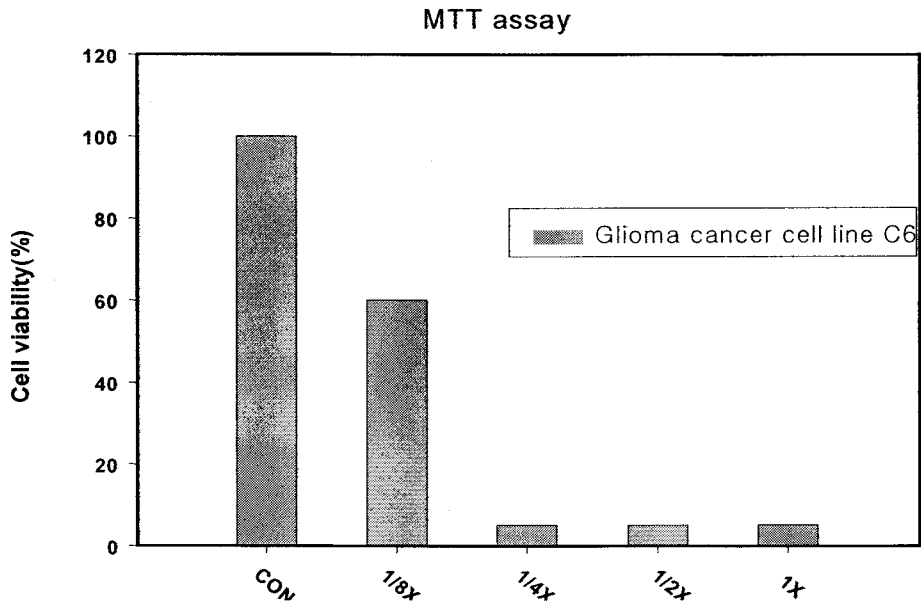


Figure 1-12. Glioma cancer cell line 의 하나인 C6 Cell에 JKK238 Culture broth를 처리했을 때 1X, 1/2X, 1/4X에서 거의 C6 cell이 죽었으며 1/8X에서는 60%정도 사는 것을 관찰할수 있었다.

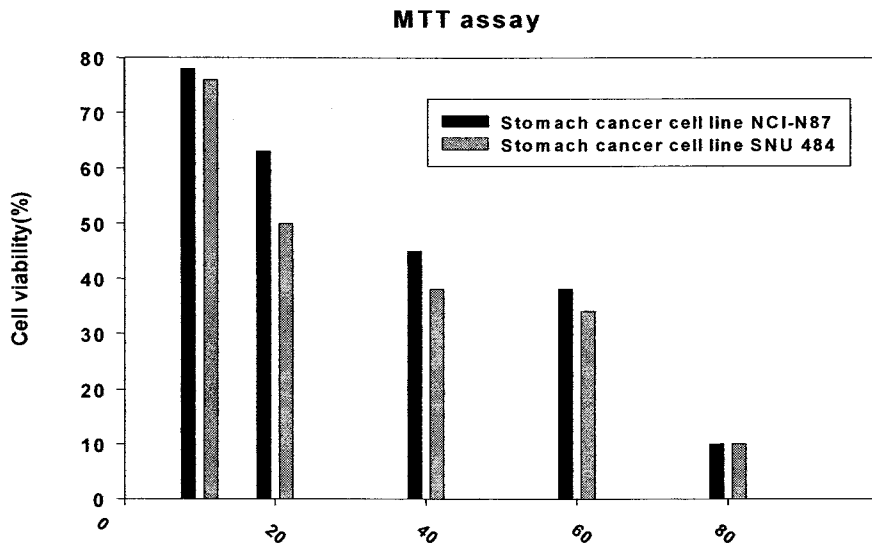


Figure 1-13. Stomach cancer cell line인 NCI-N87과 SNU 484 cell에 JKK238 Culture broth를 처리했을 때 dose-dependent하게 cell의 viability가 감소하는 것을 볼 수 있었다.

라. JKK238의 물질특성연구

1) Ninhydrin reaction을 이용한 아미노산 성분분석

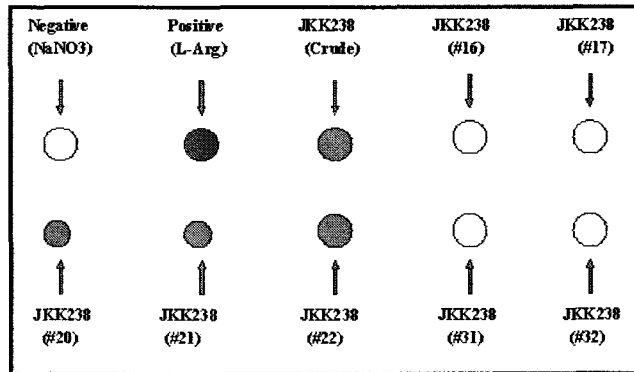


Figure 1-14. JKK238의 배양액에서 추출한 물질의 단백질 성분 분석을 위해 Ninhydrin reaction을 수행한 결과 ninydrin reaction 양성반응인 자주색을 나타낸 JKK238 fractions #20, #21, #22가 펩타이드성의 물질을 포함하고 있음을 나타내었다.

2) MALDI-TOF MS분석을 통한 분자량 측정

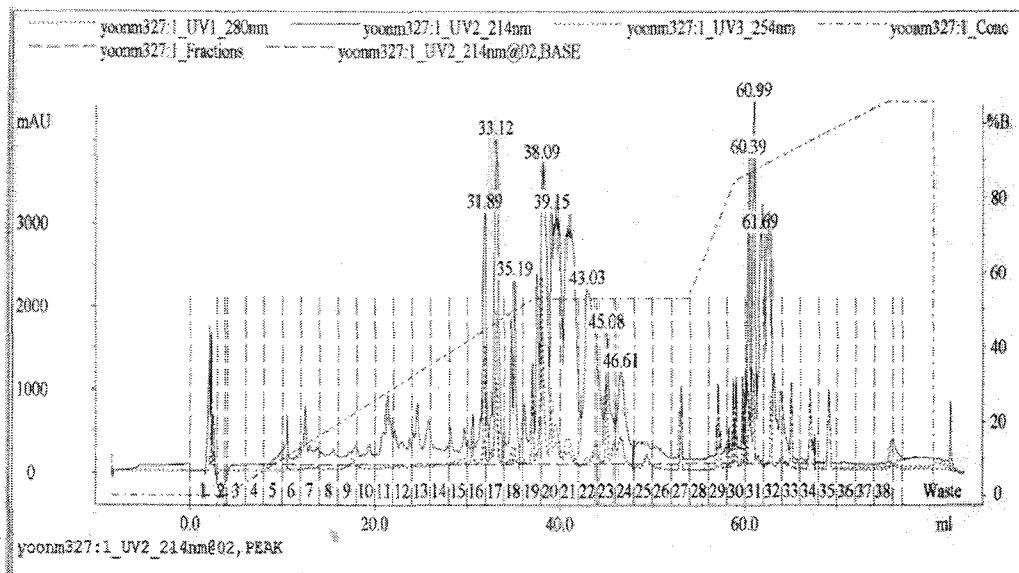


Figure 1-15. JKK238의 배양액에서 추출한 물질의 분석을 위해 FPLC를 수행한 결과 #11~14, #16, #20, #31, #32의 fraction으로부터 MALDI-TOF MS를 측정하였다.

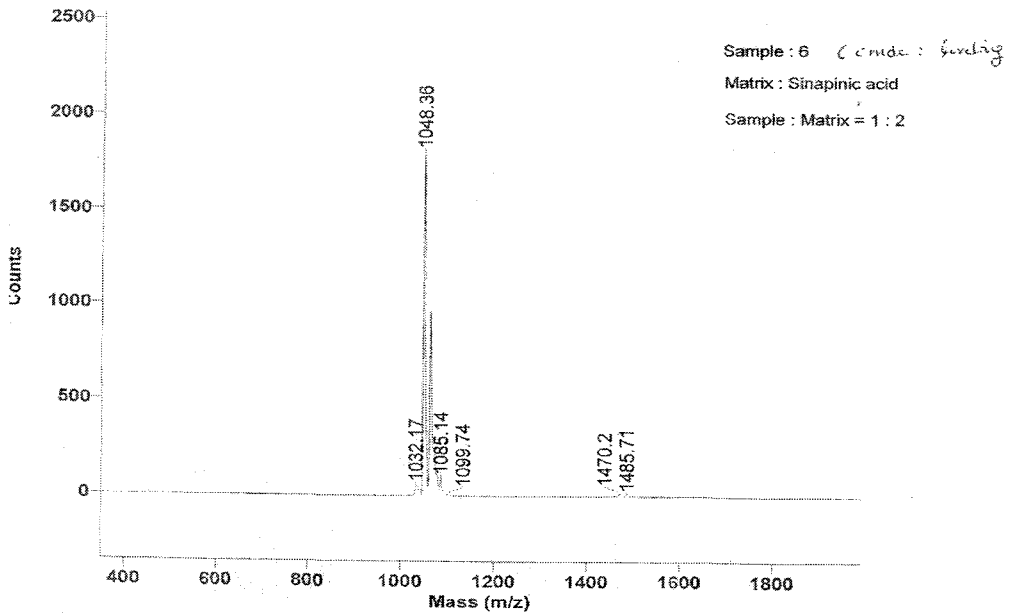


Figure 1-16. MALDI-TOF MS를 이용하여 분자량을 측정한 결과 JKK238의 배양액(crude sample)에 포함된 물질들의 분자량이 약 1000 Da 내외인 것으로 측정되었다.

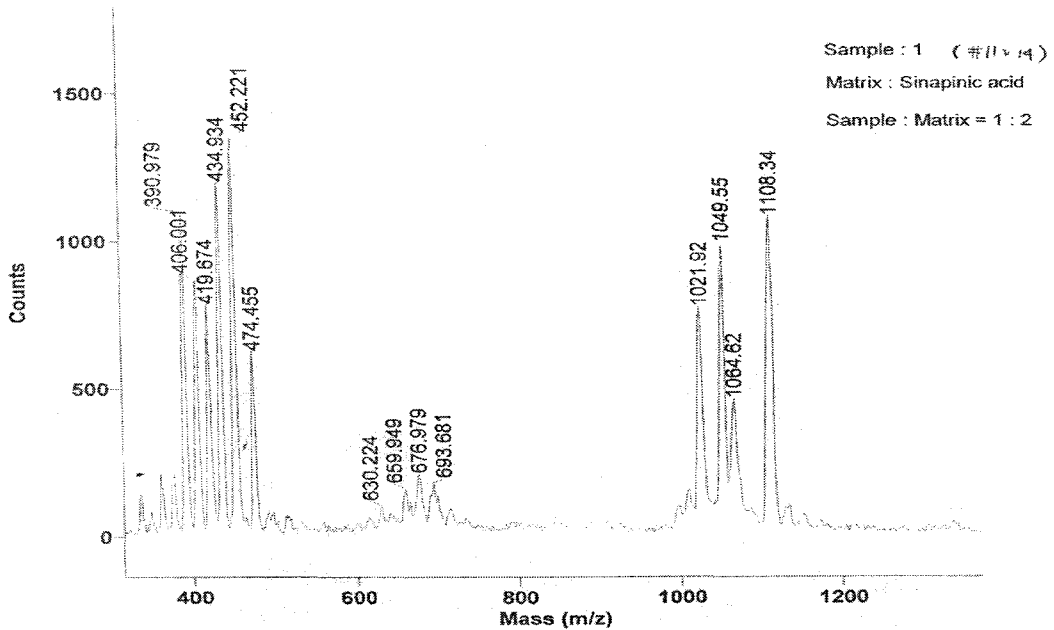


Figure 1-17. MALDI-TOF MS를 이용하여 분자량을 측정한 결과 JKK238의 배양액(#11-14)에 포함된 주요 물질들의 분자량이 1021.92 Da, 1049.95Da, 1064.62Da, 1108.34Da인 것으로 측정되었다.

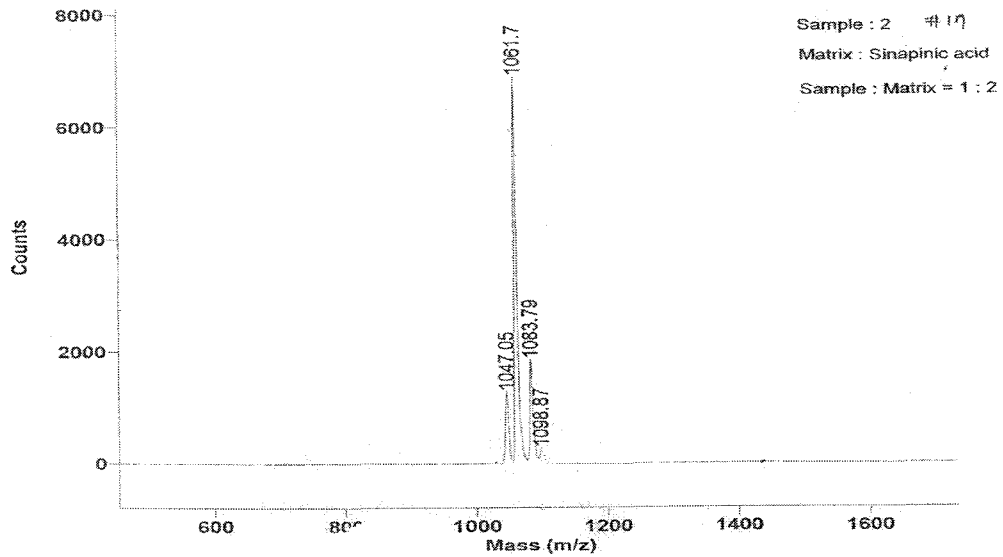


Figure 1-18. MALDI-TOF MS를 이용하여 분자량을 측정된 결과 JKK238의 배양액(#17)에 포함된 주요 물질의 분자량이 1061.7Da 인 것으로 측정되었다.

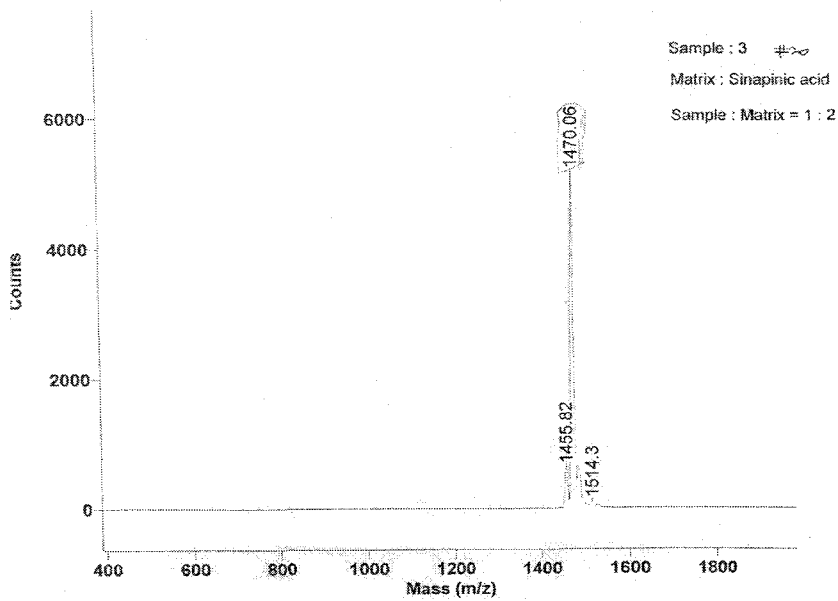


Figure 1-19. MALDI-TOF MS를 이용하여 분자량을 측정된 결과 JKK238의 배양액(#20)에 포함된 주요 물질의 분자량이 1470.06 Da 인 것으로 측정되었다.

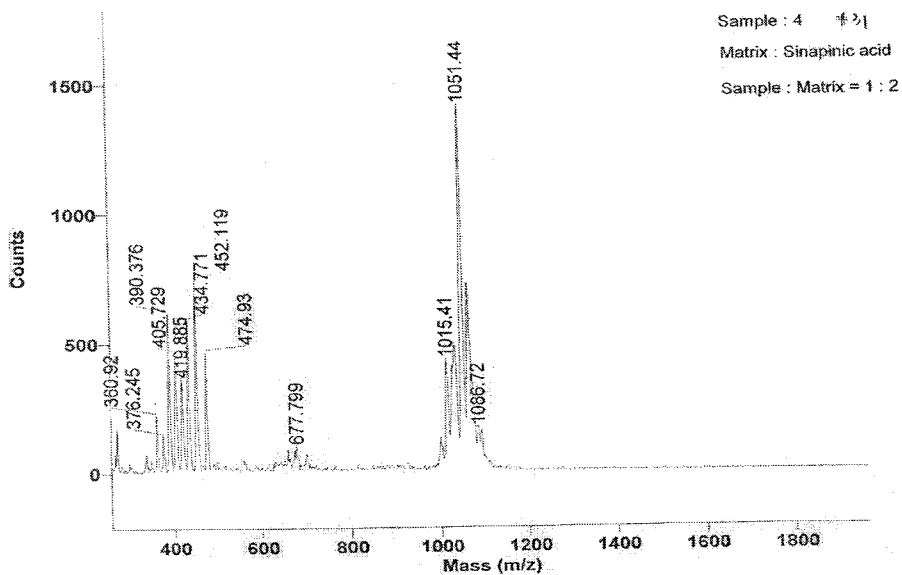


Figure 1-20. MALDI-TOF MS를 이용하여 분자량을 측정한 결과 JKK238의 배양액(#31)에 포함된 주요 물질의 분자량이 1051.44Da 인 것으로 측정되었다.

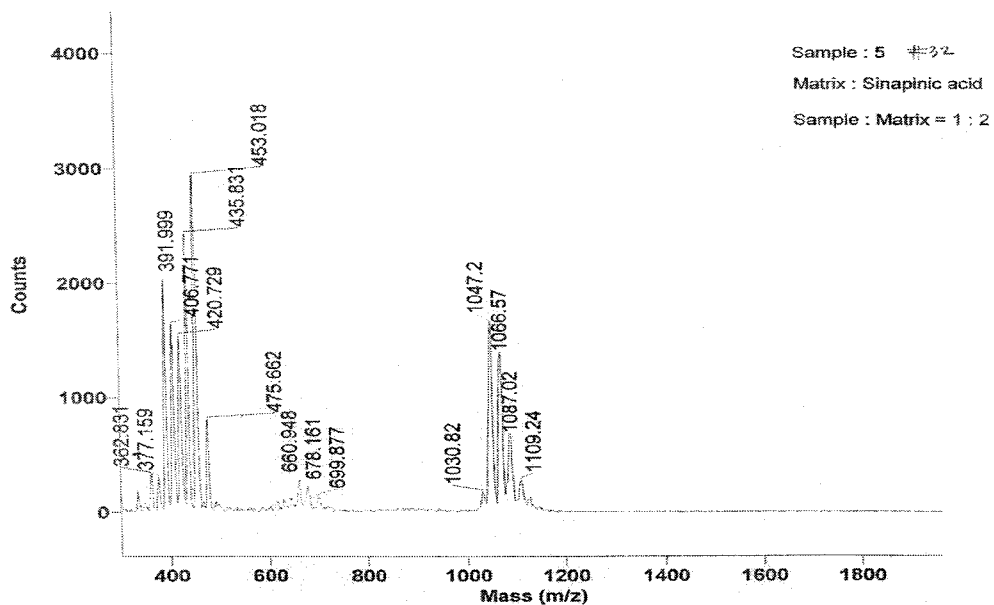


Figure 1-21 . MALDI-TOF MS를 이용하여 분자량을 측정한 결과 JKK238의 배양액(#32)에 포함된 주요 물질들의 분자량이 1030.824Da, 1047.2Da, 1066.57Da, 1087.02Da, 1109.24Da인 것으로 측정되었다.

마. JKK238균주의 배양액으로부터 얻은 물질의 NOS억제력 탐색

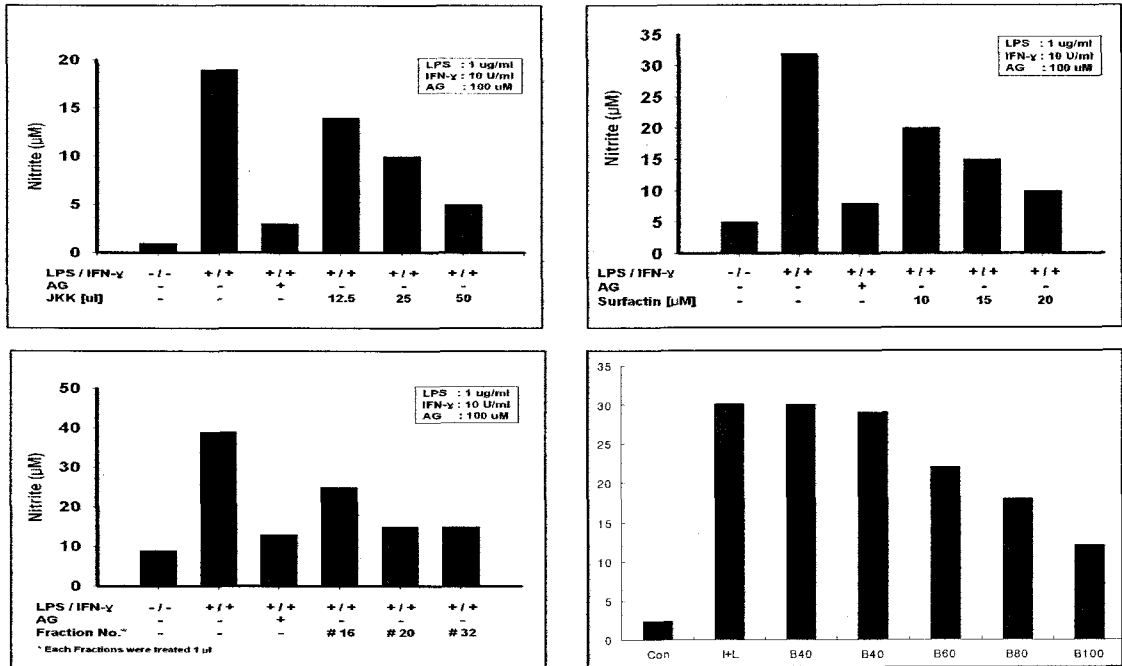


Figure 1-22. JKK238의 배양액에서 추출 및 C18 reverse phase chromatography로 분리한 물질(fraction #16, 20, 32)을 LPS와 IFN- γ 로 iNOS를 induction시킨 RAW264.7에 처리하여 Griess reagent assay를 한 결과 #16, #20, #32은 각각 40-65%의 NO생성 저해효과가 있었다. 또한 bacillus subtilis secretory lipopetides인 surfactin과 bacitracin을 처리했을 때도 고농도로 처리를 할수록 NO 저해효과가 dose-dependent하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

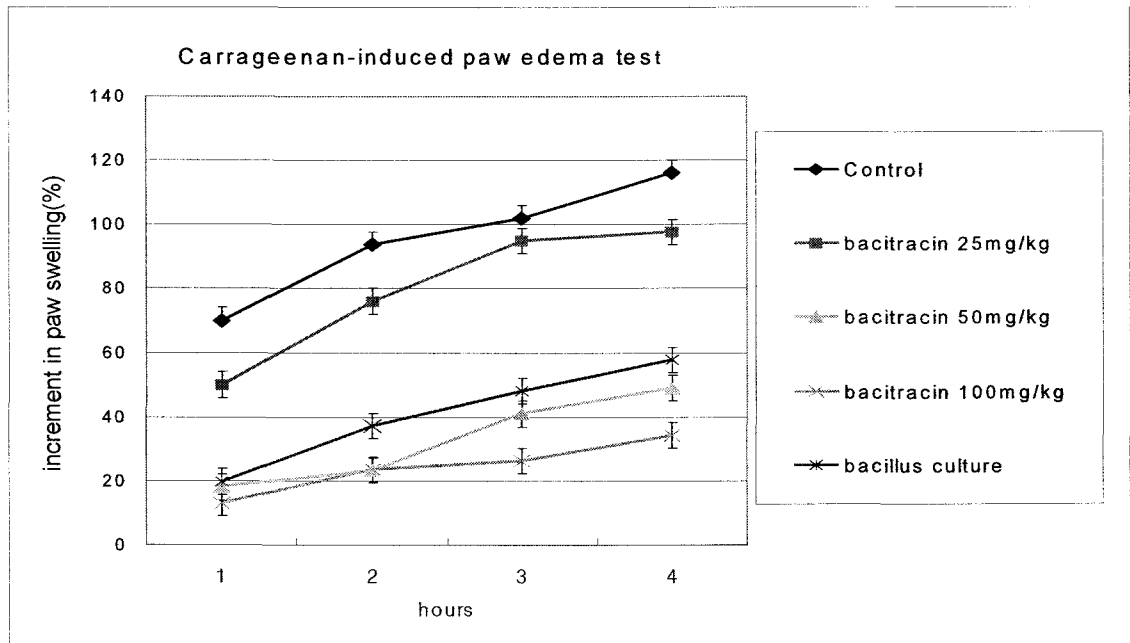


Figure 1-23. Carrageenan-induced paw edema test를 통해 *in vivo*상에서 bacillus culture와 bacitracin의 효과를 검정하였다. bacillus culture 자체와 bacitracin 100 mg/kg을 rat에 처리했을 때 paw swelling의 정도가 control에 비해서 낮아진 것을 볼 수 있었다.

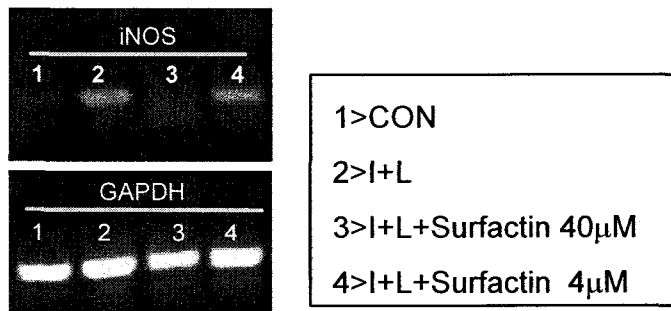


Figure 1-24. RT-PCR을 통한 iNOS의 발현량을 측정하였다. Surfactin을 40 mM을 처리했을 때 iNOS에 대한 mRNA level이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다.

바. JKK238균주의 배양액으로부터 얻은 물질의 Anti-angiogenesis effect 탐색

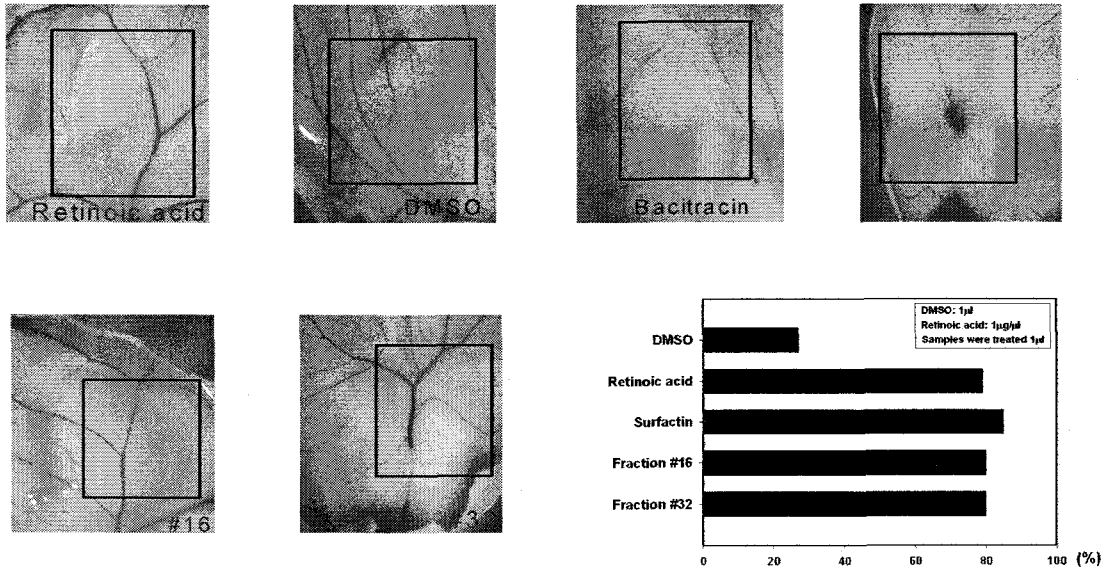


Figure 1-25. CAM Assay에 의해서 JKK238의 Anti-angiogenic effect를 측정된 결과 positive control인 RA(Retinoic acid)가 80%의 Anti-angiogenic effect를 나타내었다. 그리고 YJK238에서 분리한 분획을 처리했을 때 80% 정도의 anti-angiogenic effect가 있는 것을 알 수 있었다. 또한 bacitracin과 surfactin을 처리했을 때 역시 anti-angiogenic effect가 있는 것을 알 수가 있었다.

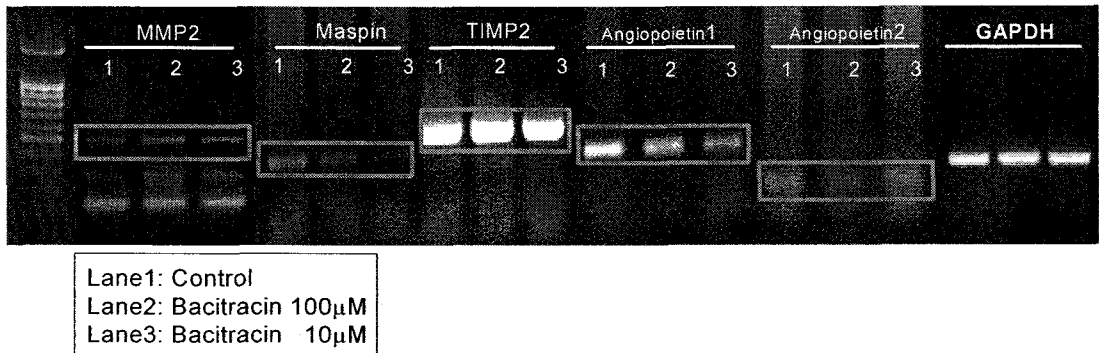


Figure 1-26. RT-PCR을 통한 angiogenic polypeptides의 발현량을 측정하였다. Breast cancer cell line 중 하나인 전이성이 강한 MDA에 angiogenic activator인 MMP2, Angiopoietin1,2에 대한 bacitracin의 mRNA 저해효과를 측정하였다. Angiopoietin1,2는 Control에 비해서 bacitracin을 처리한 경우 mRNA의 발현량이 줄어드는 경향을 볼 수 있었다. 그러나 MMP2는 bacitracin을 처리한 경우 오히려 control에 비해서 mRNA level이 증가하는 것을 볼 수 있었다. 또한 breast cancer cell에 특이적인 angiogenic inhibitor인 Maspin도 bacitracin을 처리한 경우 오히려 mRNA level이 감소하는 것을 볼 수 있었다. 그리고 MMP2의 antagonist인 TIMP2에는 bacitracin이 별 다른 영향이 없는 것을 볼 수 있었다.

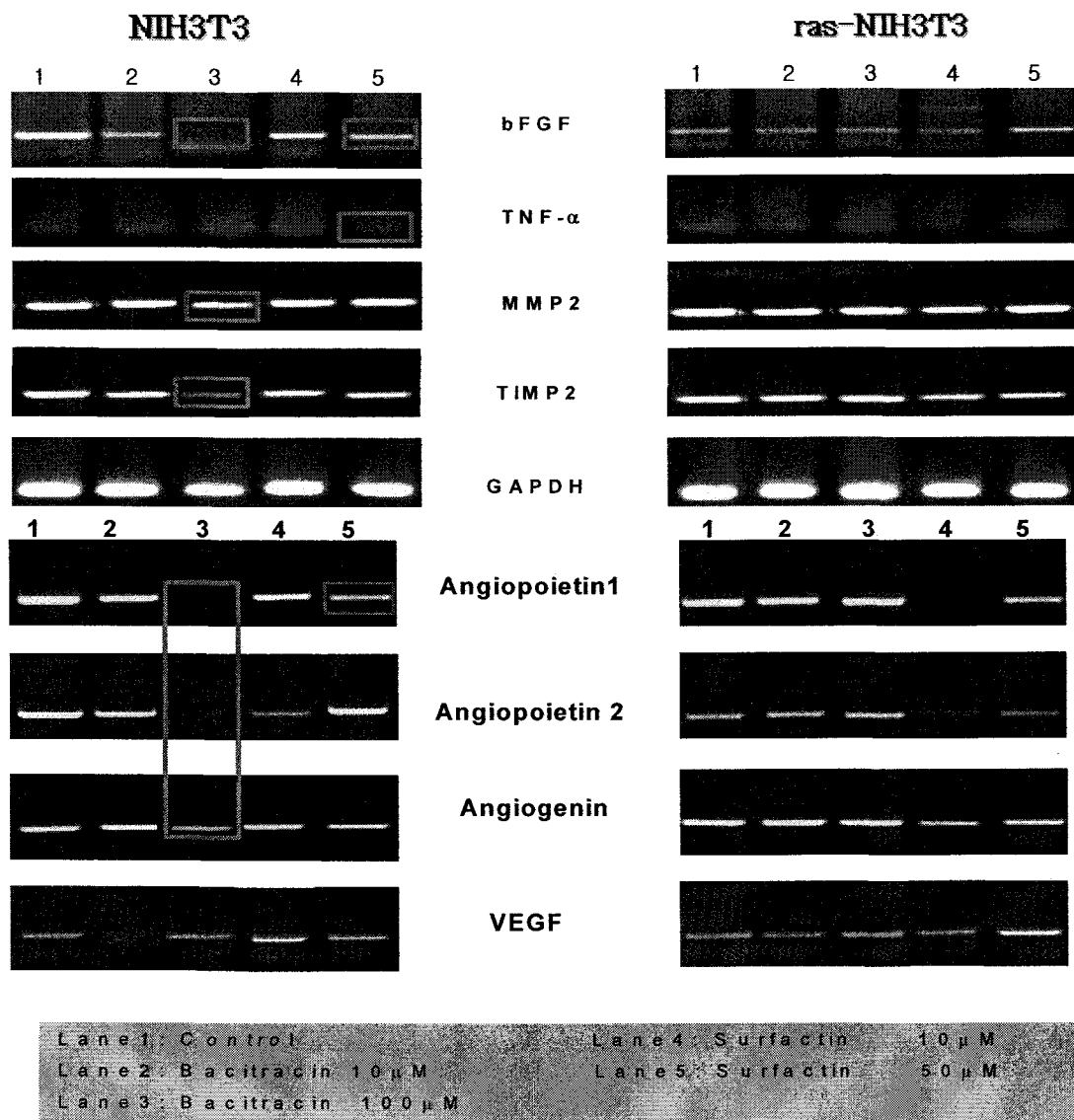


Figure 1-27. RT-PCR을 통한 angiogenic polypeptides의 발현량을 측정하였다. Fibroblast cell line인 NIH3T3 cell과 ras oncogene을 넣어서 암화시킨 ras-NIH3T3 cancer cell line에 Bacitracin과 surfactin을 처리해서 angiogenic activator인 VEGF(Vascular endothelial cell growth factor), Angiogenin, Angiopoietin1,2 MMP2의 mRNA와 angiogenic inhibitor인 TIMP2의 mRNA의 경향을 측정하였다. VEGF, angiogenin, angiopoietin1, 2의 경우 모두 ras-NIH3T3 cell에 Surfactin과 bacitracin을 고농도로 처리한 경우 mRNA level이 줄어 드는 경향이 있는 것을 알 수 있었다. 반면에 normal cell인 NIH3T3에 같은 농도로 처리한 경우 오히려 고농도로 처리를 하면 VEGF의 경우는 mRNA level이 더 증가하는 경향을 볼 수 가

있었다. 그리고 Angiogenin, angiopoietin1,2는 bacitracin을 처리한 경우는 mRNA level에 별 차이가 없는 것을 확인 할 수 있었으며, surfactin을 처리한 경우는 VEGF와 마찬가지로 고농도로 처리할수록 angiogenic activator의 mRNA level이 더 증가하는 것을 볼 수 있었다.

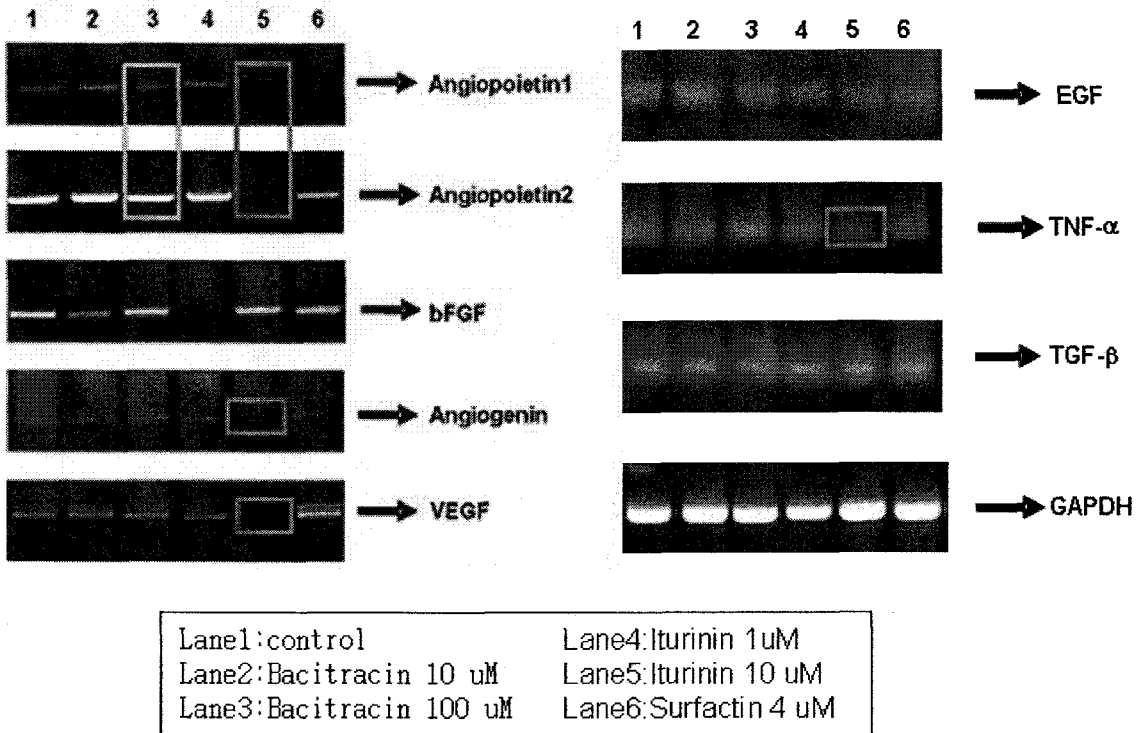


Figure 1-28. HUVEC cell에서 RT-PCR을 통한 angiogenic polypeptides의 발현량을 측정하였다. Bacitracin과 Ituria A, Surfactin을 처리해서 Angiopoietin1, Angiopoietin2, bFGF, angiogenin, VEGF, EGF, TNF-a, TGF-b에 대한 mRNA level을 살펴 보았다. Angiopoietin1, Angiopoietin2의 경우는 bacitrcin과 iturin A를 고농도로 처리했을때 아무것도 처리하지 않은 control에 비해서 mRNA level 줄어든 것을 확인 할 수 있었다. 또한 angiogenin과 VEGF, TNF-a의 경우는 iturin A를 처리했을때 mRNA level이 감소하는 것을 확인 할 수 있었다.

사. 암세포에 대한 세포독성 (cytotoxicity) 효과

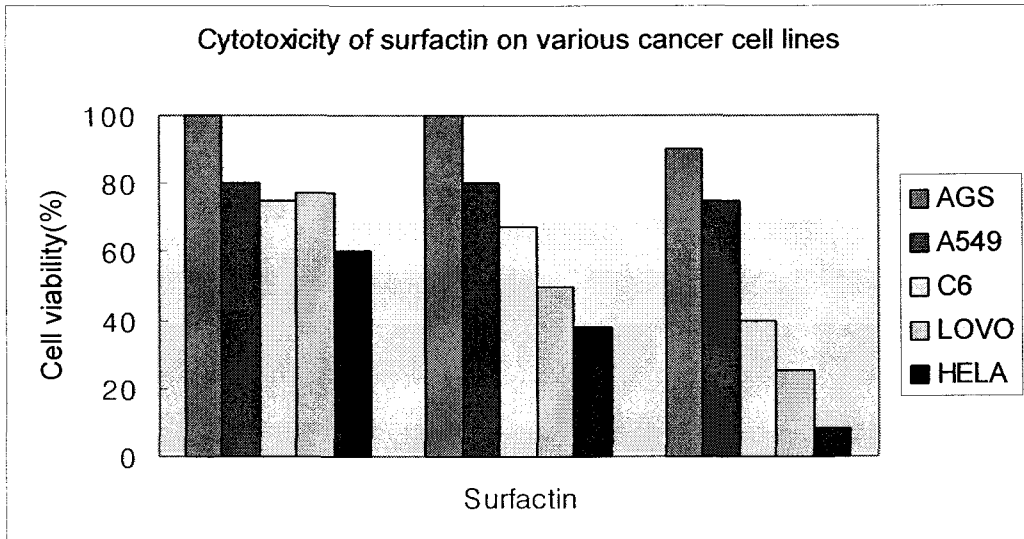


Figure 1-29. Surfactin을 여러 가지 cancer cell line에 처리해서 세포독성 효과를 측정하였다. 위암세포와 폐암 세포에서는 세포독성 효과가 별로 없는 것을 확인 할 수 있었고, glioma cell line인 C6와 대장암 세포(LoVo), 자궁암 세포(Hela)에서는 고농도를 처리할 수록 암세포에 대한 독성효과가 큰 것을 확인 할 수 있었다.

아. *Bacillus Subtilis*의 secondary metabolite 인 surfactin의 NOS 억제력 탐색

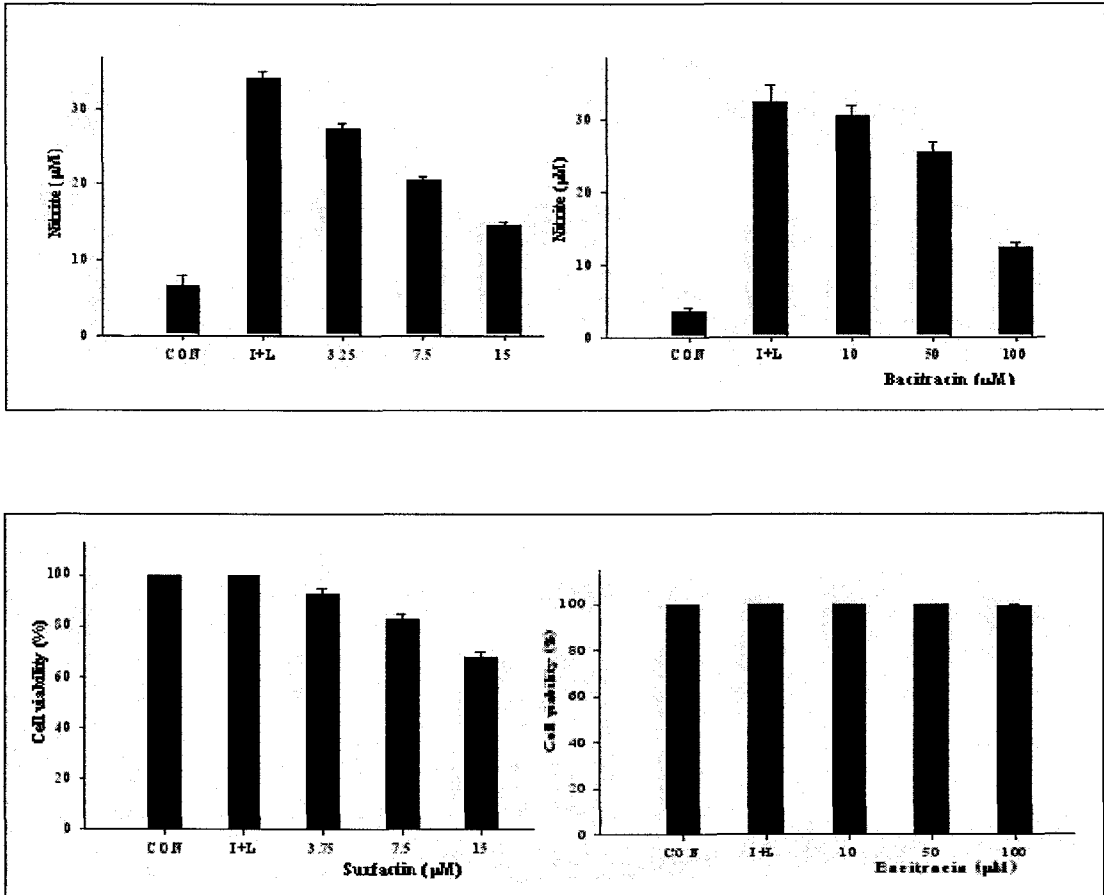


Figure 1-30. LPS와 IFN- γ 로 iNOS를 induction시킨 RAW264.7에 surfactin을 농도 별로 처리하여 Griess reagent assay를 한 결과 NO생성 저해효과가 있었다. 또한 *Bacillus subtilis* secretary lipopetides인 surfactin과 bacitracin을 처리했을 때도 고농도로 처리를 할수록 NO 저해효과가 dose-dependent하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 세포 독성 효과에서 surfactin은 세포 독성 효과를 어느 정도 띄고 있으나 Bacitracin은 고농도에서 처리하여도 효과가 없는 결과를 얻었다.

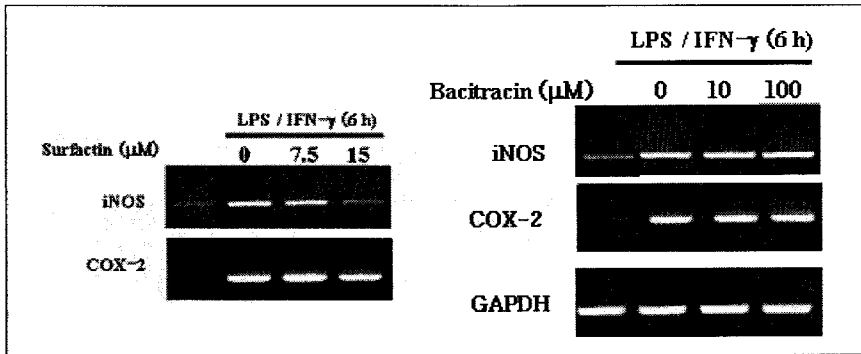


Figure 1-31. RAW 264.7 macrophages에서의 iNOS mRNA 발현이 Surfactin 과 Bacitracin 에서 농도가 증가할수록 저해됨을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 Surfactin과 Bacitracin이 transcription 단계에서 LPS/INF- γ 에 의해 유도된 NO의 생산을 방해하는 것을 보여주고 있다.

자. RAW 264.7 에서의 surfactin의 독성 효과

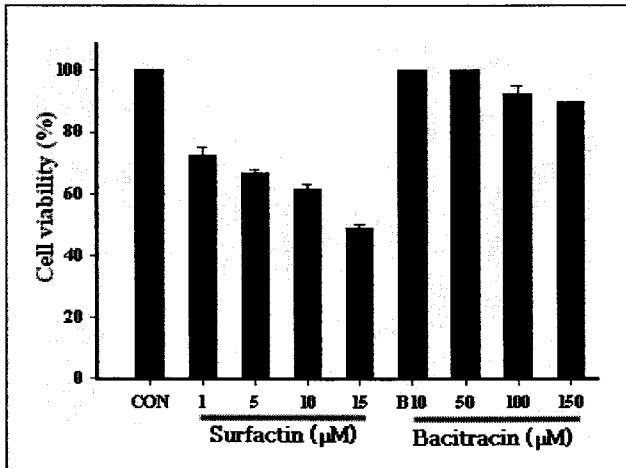


Figure 1-32. Surfactin을 RAW 264.7 macrophages 에 처리해서 세포 독성 효과를 측정하였다. Surfactin은 15 uM 정도에서 세포들이 절반 정도만 살아남는 것을 보아 세포 독성 효과를 띄고 있으나 Bacitracin은 고농도에서 처리하여도 효과가 없는 결과를 얻었다.

차. Surfactin의 신생혈관세포의 억제효능 탐색

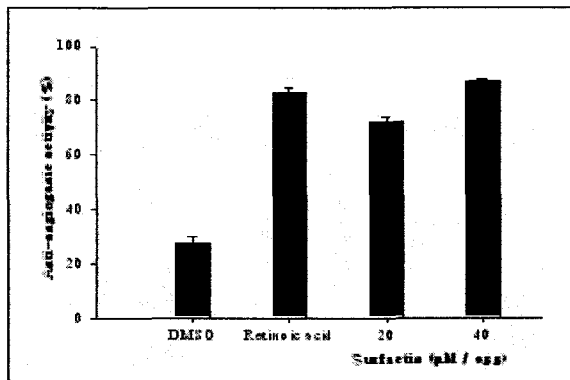
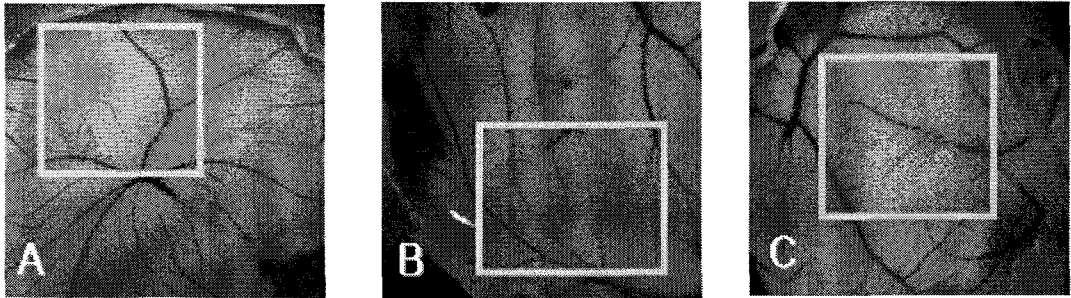


Figure 1-33. Chorioallantoic Membrane(CAM) Assay에 의해서 surfactin 의 Anti-angiogenic effect를 측정 한 결과이다. A는 1 ug/ul Retinoic acid(positive control), B는 Dimethylsulfoxide (negative control)로, C는 surfactin 40 uM를 각각 CAM의 vascular membrane 에 처리하였다. 그 결과 surfactin을 처리한 곳에서는 positive control인 Retinoic acid를 처리한 것과 같이 신생혈관세포의 억제를 보여주고 있다.

카. Surfactin에 의한 endothelial cell의 tube formation 억제 탐색

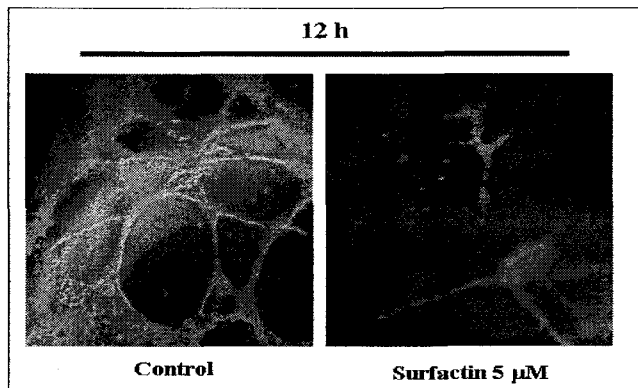


Figure 1-34. Human endothelial cell에서 anti-angiogenic효과를 보기 위해 tube formation assay를 수행하였다. matrigel이 깔린 96-well plate에 HUVECs 세포를 키운 후, surfactin을 처리한 결과, 대조군은 세포간에 네트워크를 형성하면서 튜브 형성 구조를 이루는 반면, surfactin을 처리한 세포에서는 그러한 현상이 관찰되지 않았다. 이것은 surfactin이 anti-angiogenic 물질일 수 있다는 가능성을 제시하였다.

타. Surfactin의 대장암 세포 LOVO, HT-29 에서 세포독성(cytotoxicity) 효과

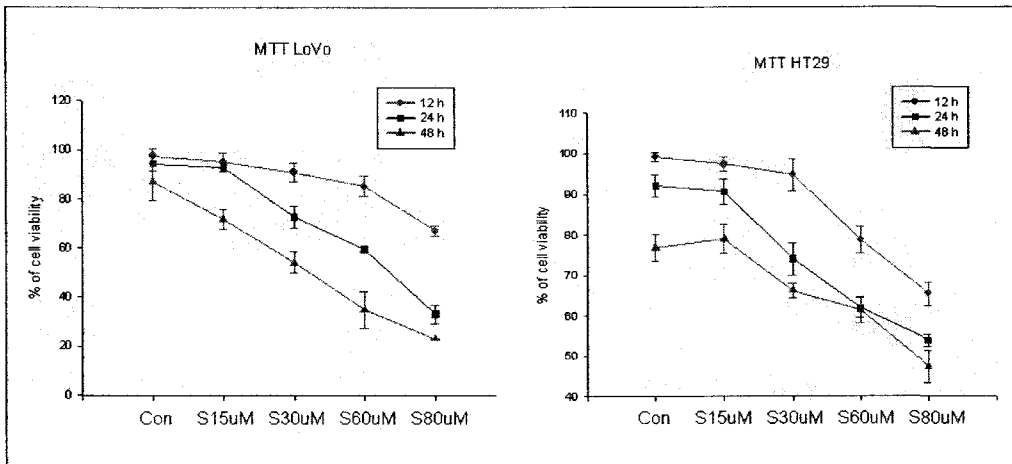


Figure 1-35. 대장암 세포인 LOVO와 HT-29에 Surfactin을 시간과 농도별로 처리해서 세포 독성 효과를 측정하였다. Surfactin을 60 uM 이상 처리하면 세포의 반 이상이 24시간 이후 죽는 것을 확인할 수 있었으며, 12시간 처리시에는 농도 별로 감소하는 경향이 있으나 효과가 크지는 않았다. 48시간 처리 시, 세포 대부분이 죽는 것을 확인하였다.

파. surfactin 에 의한 LOVO, HT-29의 세포 주기 억제 효과 탐색

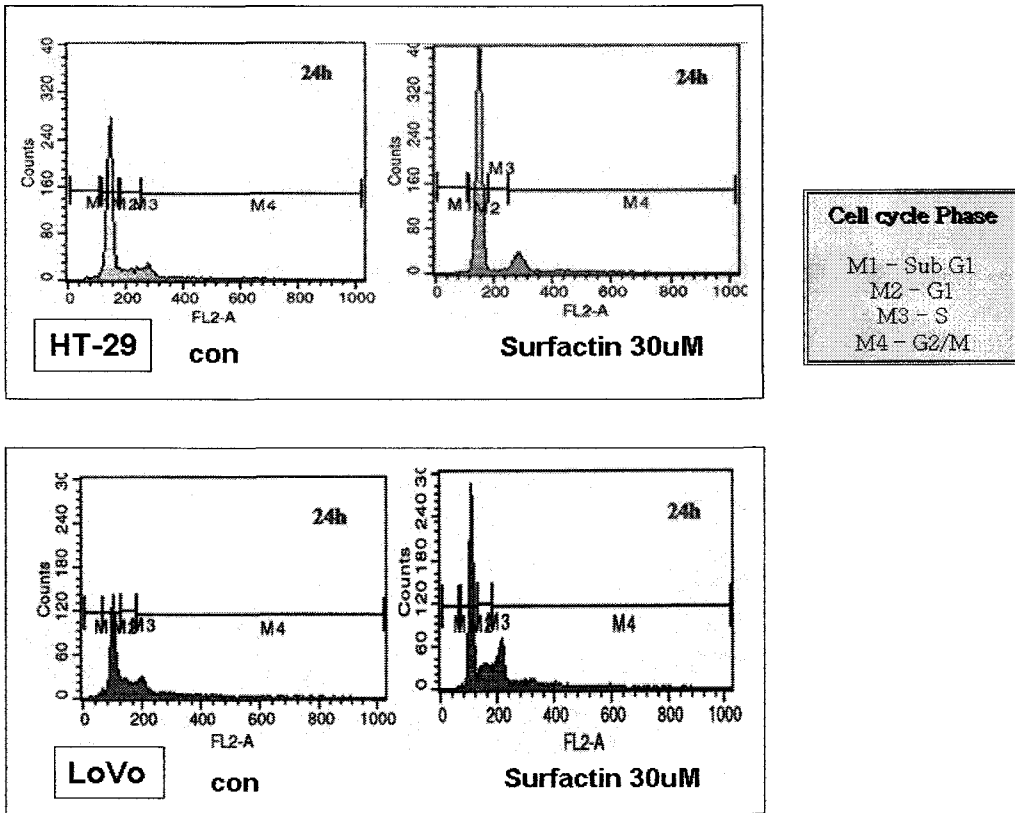


Figure 1-36. Surfactin을 처리했을 때, 대장암 세포들이 growth를 하지 않는 이유를 알아보기 위해 Flow cytometry를 이용하여 세포 주기를 측정하였다. 그 결과, 대조군에 비해 surfactin을 30uM 처리한 세포에서 S phase의 현저한 세포 수의 차이를 보였다. 이것은 세포가 G1에서 S phase로 주기가 돌아가지 못하고 억제됨으로 설명할 수 있다.

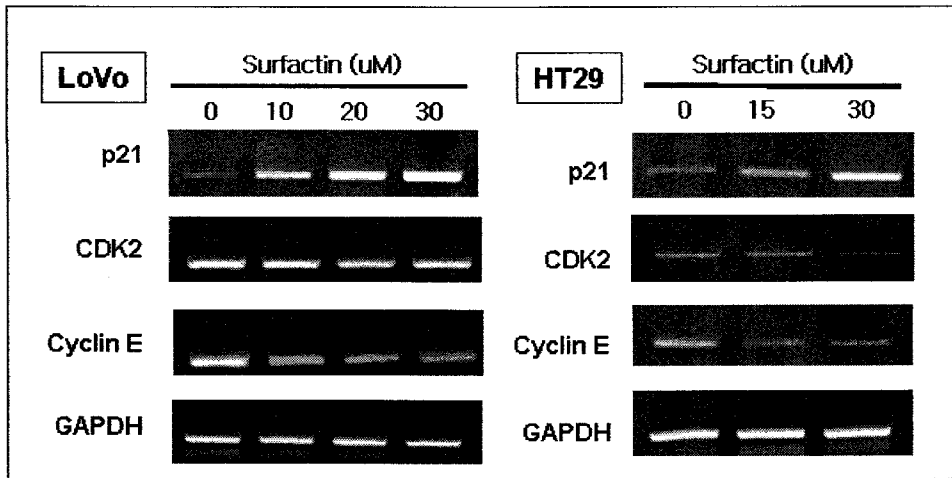


Figure 1-37. Flow cytometry 에 의해 cell cycle이 arrest 됨을 토대로하여 G1/S phase check point 에의 분자들을 mRNA level에서 확인하였다. p21은 Cyclin Dependent Kinase(CDK) 2의 inhibitor로서 G1/S 의 transition에 대표적인 molecule 이다. G1에서 S로 cell cycle 이 넘어갈 시 관여하는 분자들 CDK2-cyclin E complex 가 있고 p21는 이 둘의 결합을 억제하는 것으로 알려져있다. 실험 결과, p21의 mRNA 농도는 surfactin을 처리할 수록 증가됨을 볼 수 있었고, 그에 반해 CDK2와 cyclin E의 발현양은 억제됨이 관찰되었다. (GAPDH는 concentration control) 이로서 cell cycle 이 arrest 됨을 분자적 레벨에서 확인되었다.

하. Surfactin 이 LOVO에서 Apoptosis 유도함을 탐색

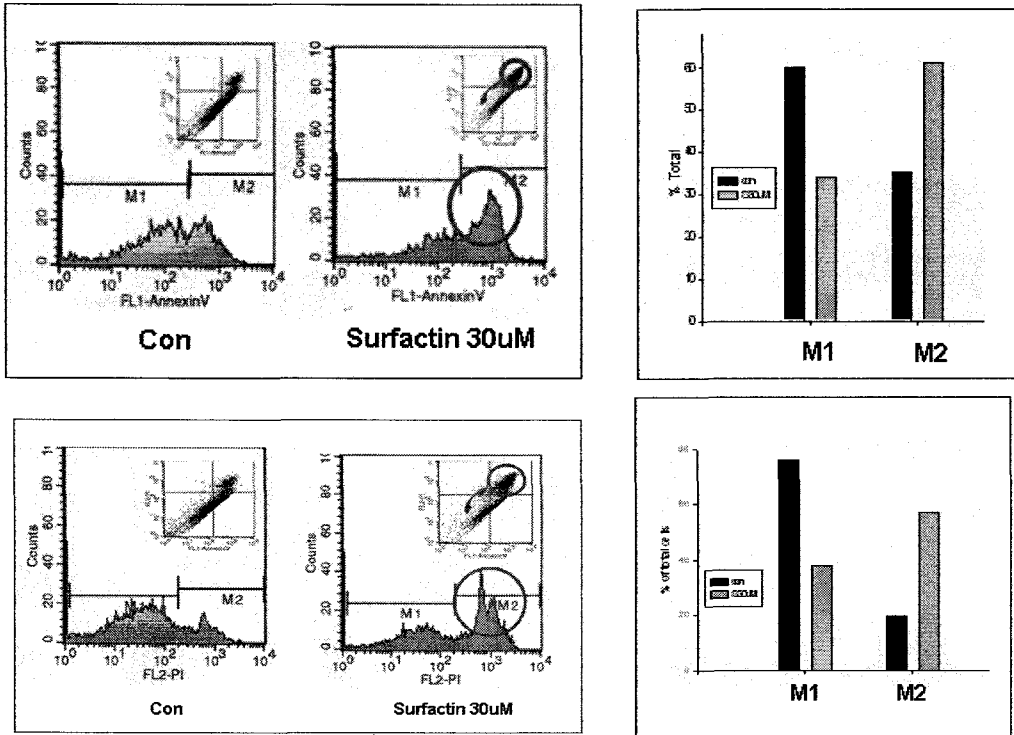


Figure 1-38. cell cycle arrest와 동시에 surfactin이 apoptosis를 유도하는 지에 대하여 알아보기 위해 Annexin V staining을 하였다. Annexin V는 Apoptosis가 일어날 때 membrane phospholipid phosphatidylserine(PS) 가 outer membrane 으로 translocate 되는데 이때 Annexin V가 PS 와 강한 Affinity를 가져 측정이 가능하게 된다. Annexin V는 membrane integrity의 손실만을 측정할 수 있기 때문에 apoptotic, necrotic 과정 둘다 관측이 되므로 Propidium Iodine(PI)와 함께 처리하여 구분할 수 있다. 초기 apoptosis 에서는 Annexin V는 양성, PI는 음성으로 관찰되지만, 늦은 apoptosis 단계에서는 둘다 양성으로 관찰된다. 실험 결과, 30uM surfactin 처리 시 Annexin V와 PI staining 둘 다 양성반응함이 관찰되었고, 이는 late apoptosis 를 유도함으로 결론지을 수 있다.

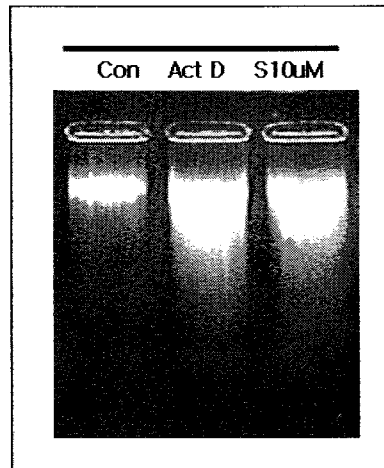


Figure 1-39. 세포사가 시작되는 세포 내의 일반적인 생화학적 특징 중의 하나는 DNA-fragmentation 의 현상을 유발하는 것이다. 세포사를 유도하는 물질로 알려진 Actinomycin D 를 처리했을 때와 같이 surfactin 을 처리하면 끌리는 현상을 일으키는 것으로 보아 세포사가 유도됨을 확인할 수 있었다.

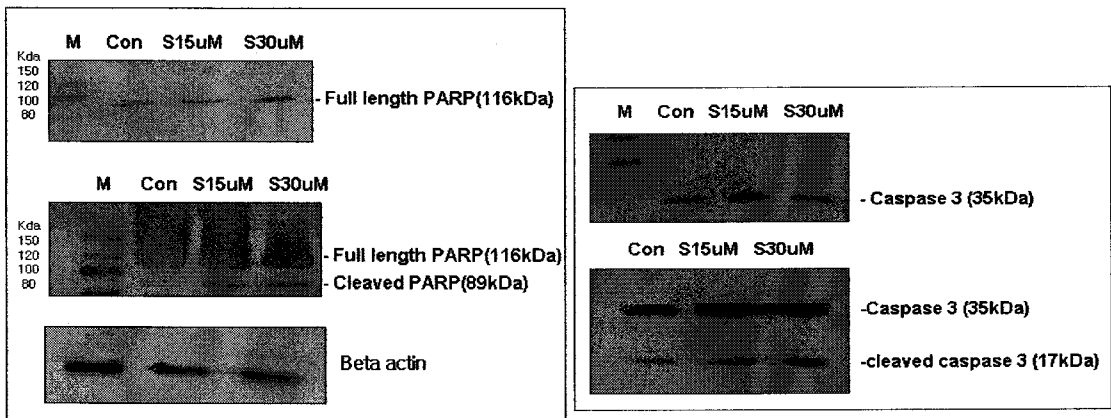


Figure 1-40. 세포사가 일어남을 보여주는 또 다른 생화학적 특징 중의 하나는 caspase의 활성화이다. Caspase는 Cystein protease의 한 종류로서 세포사에 관여하는 세포사에 관여하는 poly(ADP-ribose)polymerase(PARP), caspase 3 등의 단백질을 단계적으로 분해함으로써 세포사의 특성인 세포질의 수축, 세포막의 blebbing, 핵수축 및 DNA-fragmentation 등의 현상을 유발시키는 것으로 보고되고 있다. 이를 확인하기 위해 surfactin을 15, 30 uM처리한 Lovo 세포에서 단백질을 분리하여 immunoblotting을 시행하였다. 그 결과 PARP와 caspase 3의 cleavage가 일어나는 것을 확인하였고 이는 surfactin이 apoptosis를 야기시킴으로 결론지을 수 있다.

제 2 세부과제 :

Bacillus 생리활성 물질의 생리 활성 작용 기전 규명 (성균관대학교 유전공학과 권무식)

1. 연구 수행 방법

가. *Bacillus subtilis* JKK238 균주의 확보 및 배양

연구에 사용할 *Bacillus subtilis* JKK238 균주는 농촌과학기술원으로부터 분양 받아 계대 배양하여 사용하였다. 균주의 배양은 LB agar plate에서 37°C에서 배양하였으며, genomic DNA의 추출을 위하여 균주를 LB broth에 접종한 후 37°C에서 12시간 동안 현탁 배양 하였다.

나. Library Screening을 위한 iturin A ORF의 부분 클론 제작

1) Genomic DNA의 분리

B. subtilis JKK238 genomic DNA는 G-DEX™ (Intron Co., Korea)를 이용하여 분리하였으며 제조사의 방법을 따라 수행하였다. 먼저 12시간 현탁배양한 균주 배양액 5 ml을 원심분리(10,000×g, 2분, 4°C)하여 세포를 모은 후, 600 μl의 lysis buffer에 현탁시켰다. 이를 65°C에서 10분간 배양한 후 20 μg의 RNaseA를 37°C에서 20분간 처리하였다. 200 μl의 protein precipitation buffer를 넣고 1분간 교반한 후 4°C에서 10분간 반응하였다. 이를 원심 분리(10,000×g, 5분, 상온) 한 후 상층액을 취하여 600 μl의 isopropanol과 혼합한 뒤 상온에 10분간 방치하였다. 원심분리(10,000×g, 10분, 4°C)하여 genomic DNA를 침전시키고 건조 후 100 μl의 증류수에 용해하였으며 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

2) PCR primer 제작 및 PCR

기존의 보고된 *B. subtilis*의 iturin A synthetase 유전자는 National Center for Biotechnology Information (NCBI, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, MD)에서 제공하는 Genbank database에서 검색하여 염기 서열 정보를 확인하고 genomic DNA library를 screening 할 probe 제작을 위한 polymerase chain reaction (PCR) primers를 제작하였으며 그 염기서열은 다음과 같다.

ituBF : 5'-CCC GGA TCA TGA AGC CGT CAT GTT-3' (24 mers)

ituBR : 5'-TCA GGA TCG ACG GTA TAC ATG GTC-3' (24 mers)

ituCR : 5'-ATC CTG ACC ATG ACG AAC CAA ACG-3' (24 mers)

ituCR : 5'-CGA TCT CAT GTT CGC AGA TAA TCG-3' (24 mers)

PCR은 반복 수행을 통하여 조건을 확립하고 수행하였다. PCR은 pre-mix(Super-Bio. Co., Seoul)를 이용하여 수행하였으며, PCR의 총 반응액은 20 μ l로 하여 1 μ l의 genomic DNA, 10 μ l의 2 \times Reaction buffer, 각 10 pmole의 primer set를 혼합하였다. 먼저 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 주형 DNA를 변성시킨 후 95 $^{\circ}$ C 1분, 55 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 1분의 반응 사이클을 30회 반복 시행하였으며 마지막에 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응하였다. 이를 통하여 각각 약 870 bps와 800 bps에 해당하는 PCR 산물을 0.8% agarose gel에서 전기영동을 수행하여 확인하였다.

3) PCR 산물의 Cloning.

iturin의 부분 유전자의 PCR 산물에 대한 클로닝은 pGEM-T 벡터시스템을 이용하였다. 반응액은 총 10 μ l로 하여 iturin 유전자의 PCR 산물 3 μ l (0.3 μ g), 5 μ l의 2 \times ligation buffer, 1 μ l (0.1 μ g)의 pGEM-T 벡터, 1 μ l의 T4 DNA ligase (Promega Co., Madison, WI)를 혼합하여 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 이중 4 μ l를 취하여 *Escherichia coli*. DH5 α 에 CaCl₂를 이용한 방법으로 형질전환한 후 5-bromo-4-chloro-3-indoylyl- β -galactopyranoside (X-gal)과 isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)가 첨가된 배지에서 blue/white colony selection을 통하여 재조합 유전자의 벡터가 삽입된 클론을 확인하였다.

4) 염기서열 분석

PCR을 통하여 분리한 iturin의 부분 유전자의 염기서열은 ABI PRISM 377 Genetic Analyzer를 이용하여 염기서열을 결정하고 분석하였다. SP6와 T7 promoter를 사용하여 분석한 염기 서열을 통합하여 *itu B*와 *itu C*의 상동성을 분석하였다.

다. Cox-2 지해 효과 검증

Mouse macrophage like cell line, RAW 264.7을 1×10^6 만큼을 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C incubator에서 10% FBS가 포함된 RPMI 1640의 배지를 사용하여 1시간 동안 배양 한 후, 배지를 갈아주고 LPS (1 μ g/ml)와 IFN- γ (10U/ml)의 iNOS 유도물질을 처리하여 induction 시키고 *Bacillus subtilis* JKK238를 72시간 배양한 후 얻은 상층액을 각각 200 μ l, 50 μ l, 10 μ l를 처리하여 24시간 재 배양한 세포의 배지를 사용하였다. 실험은 Prostaglandin E2 enzymeimmunoassay (EIL) system (Amersham Pharmacia Biotech. Sweden)를 이용하여 수행하였다. 먼저 100 μ l의 1 \times dilution assay buffer를 비특이적 결합(non-specific binding ; NSB) well에 분주하고, 50 μ l의 1 \times dilution assay buffer를 zero (0) standard well에 분주하고, 각각 2.5, 5, 10, 20, 40, 160, 320 pg of PGE2(prostaglandin E2)/50 μ l되게 연속 희석 해 놓은 시료를 50 μ l씩 well에 분주하였다. 그리고 200 μ l, 50 μ l, 10 μ l의 *Bacillus subtilis*

JKK238 배양액의 상층액을 처리한 배지를 50 μ l씩 분주하였다. 그런 다음 50 μ l의 prostaglandin E2 antibody를 blank와 NSB를 제외하고 분주하였다. 그런 다음 prostaglandin E2 conjugate를 모든 well에 50 μ l씩 분주하고 덮개를 씌워서 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. wash buffer로 4번 washing을 해 주고, 완전히 buffer를 제거 해 준 후, 150 μ l의 3, 3', 5, 5' tetramethylbenzidine (TMB) 기질을 첨가 한 후 30분 동안 암실에 반응시켰다. 반응이 끝난 후 450nm에서 optical density (OD)를 측정하였다.

라. *Bacillus subtilis* JKK238 균주의 유효 물질의 발현 조절 인자 탐색 및 유전자 분리

1) Genomic DNA의 분리

Genomic DNA의 분리는 앞에서 서술한 방법을 사용하였다.

2) PCR primers 제작 및 PCR

기존의 보고된 *B. subtilis*의 발현 조절 인자들을 검색하여, 그중 항생물질 생산에 관련된 전사 조절 인자인 SigW, 유효 물질들이 생산되는 시기인 stationary phase로의 진행을 막고 있는 억제 인자인 AbrB, population control 및 competency에 관련된 quorum sensing 유전자들(ComQ, ComX, ComP, ComA)을 타겟으로 정하고, 유전자는 National Center for Biotechnology Information (NCBI, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, MD)에서 제공하는 Genbank database에서 검색하여 염기 서열 정보를 확인하였다. 이들을 분리해 내기 위한 polymerase chain reaction (PCR) primers를 제작하였으며 그 염기서열은 다음과 같다.

sigW-F : 5'-CCT TTT GAA ACG AAG CTC GTA TAC-3' (24 mers)
sigW-R : 5'-AAG CTG CAC AAT TTG TTC AGG ACA-3' (24 mers)
comA-F : 5'-ATG AAA AAG ATA CTA GTG ATT GAT-3' (24 mers)
comA-R : 5'-TTA AAG TAC ACC GTC TGA TTT CGC-3' (24 mers)
abrB-F : 5'-TTG GGA GGA GAA TGT TTA TGA AAT-3' (24 mers)
abrB-R : 5'-AAA CGT TCT TGT GTC ATA ACA AGA-3' (24 mers)

PCR은 반복 수행을 통하여 조건을 확립하고 수행하였다. PCR은 SuperTaq(Super-Bio. Co., Seoul)를 이용하여 수행하였으며, PCR의 총 반응액은 10 μ l로 하여 1 μ l의 genomic DNA, 1 μ l의 10 \times Reaction buffer, 각 10 pmole의 primer set를 혼합하였다. 먼저 95 $^{\circ}$ C에서 3분간 주형 DNA를 변성시킨 후 95 $^{\circ}$ C 30초, 55 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 30초의 반응 사이클을 30회 반복 시행하였다. 이를 통하여 각각 564 bps(sigW), 646 bps(comA) 그리고 291 bps(abrB)에 해당하는 PCR 산물을 0.8% agarose gel에서 전기영동을 수행하여 확인하였다.

3) PCR 산물의 Cloning.

증폭된 *sigW*, *comA*, *abrB* 유전자를 포함하는 절편들은 pGEM-T easy 벡터시스템을 이용하였다. 반응액은 총 10 μ l로 하여 유전자의 PCR 산물 3 μ l (0.3 μ g), 5 μ l의 2 \times ligation buffer, 1 μ l (0.1 μ g)의 pGEM-Teasy 벡터, 1 μ l의 T4 DNA ligase (Promega Co., Madison, WI)를 혼합하여 4 $^{\circ}$ C 상온에서 12시간 동안 반응시켰다. 이를 *Escherichia coli*. DH5 α 에 CaCl₂를 이용한 방법으로 형질전환한 후 X-gal과 IPTG가 첨가된 배지에서 blue/white colony selection을 통하여 재조합 유전자의 벡터가 삽입된 클론을 확인하였다

4) 염기서열 분석 및 염기서열에서 추출한 단백질의 3차구조 예상

PCR을 통하여 분리한 조절 인자들의 유전자를 포함한 절편들의 염기서열은 ABI PRISM 3730 Genetic Analyzer를 이용하여 염기서열을 결정하고 분석하였다. SP6와 T7 promoter를 사용하여 분석한 염기 서열을 통합하여 National Center for Biotechnology Information (NCBI, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, MD)에서 제공하는 Genbank database에서 염기 서열 정보의 상동성을 분석하였다. 밝혀진 염기서열을 바탕으로 deduced amino acid 서열을 알아내고 이를 이용하여 웹 상 (<http://www.expasy.ch/swissmod/>)에서 제공하는 단백질 3차 구조를 예상하여 기존에 밝혀진 단백질들과 비교하여 보았다.

마. Quorum sensing 유전자의 검색을 위한 genome walking

Quorum sensing 유전자는 특성상 *Bacillus* 종마다 상당한 상이성을 보여 주고 있다. 이를 분리해 내기 위하여 기존 분리된 *comA* 유전자에서부터 upstream region으로의 genome walking 방법을 선택하게 되었다. Genome walking은 Universal Genome WalkerTM Kit (Clontech Laboratories, Inc.)를 사용하여 수행하였다. 전반적인 수행 방법은 아래 그림과 같다(Figure 2-1).

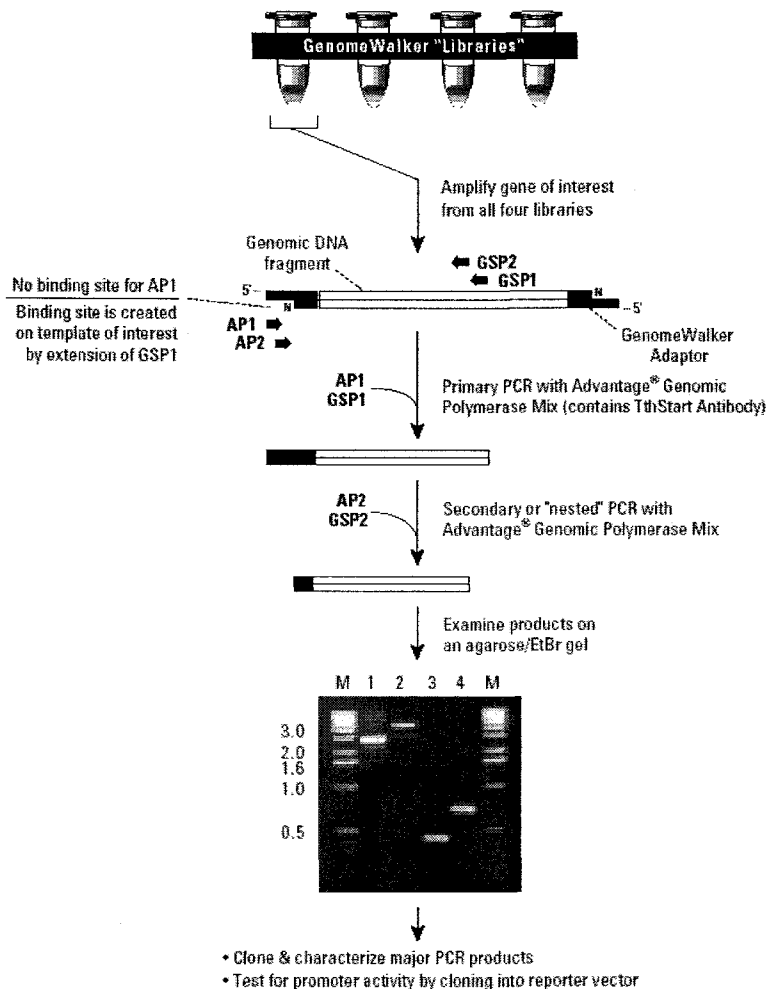


Figure 2-1. Flow chart of the GenomeWalker™ protocol.

1) GenomeWalker Libraries 제작

분리되어진 genomic DNA 25 μl (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)와 8 μl 의 restriction enzyme (*DraI*, *EcoRV*, *PvuII*, *StuI* 등 총 4개), 10 μl 의 Restriction enzyme buffer, 57 μl 의 deionized H_2O 로 반응 키셔 genomic DNA를 절단하고 동일 volume의 phenol을 이용하여 기타 단백질들을 제거하였다. 준비되어진 잘려진 genomic DNA 4 μl 와 1.9 μl 의 GenomeWalker Adaptor (25 μM), 1.6 μl 의 10 \times ligation Buffer, 0.5 μl 의 T4 DNA ligase (6 units/ μl)를 혼합하여 16 $^\circ\text{C}$ 에 Overnight 반응 시켜 adaptor를 연결하고 70 $^\circ\text{C}$ 에서 5분간 반응을 종결시키고 72 μl 의 TE(10/1, pH 7.4)를 첨가하여 Libraries를 제작하였다.

2) Primary PCR

제작된 Libraries 1 μ l, 37.8 μ l DW, 5 μ l 10 \times *Tth* PCR Reaction Buffer, 1 μ l dNTP (10 mM each), 2.2 μ l Mg(OAc)₂ (25 mM), 1 μ l의 AP1 (10 uM, adaptor primer), 1 μ l *Taq* Polymerase와 1 μ l의 GSP1(10 uM, gene specific primer)을 첨가하여 mixture를 만든 후, 94 $^{\circ}$ C에서 25초, 72 $^{\circ}$ C에서 3분간 7 cycles을 수행하고, 94 $^{\circ}$ C에서 25초, 67 $^{\circ}$ C에서 3분간 32 cycle을, 마지막으로 반응을 안정하게 종결하기 위해 67 $^{\circ}$ C에서 7분을 수행하였다.

3) Secondary PCR

수행되어진 primary PCR 산물 1 μ l를 DW 49 μ l로 희석시킨 후, secondary PCR 반응액을 만들었다. 반응액은 희석된 primary PCR 산물 1 μ l, DW 37.8 μ l, 5 μ l 10 \times *Tth* PCR Reaction Buffer, 1 μ l dNTP (10 mM each), 2.2 μ l Mg(OAc)₂ (25 mM), 1 μ l의 AP2 (10 uM, adaptor primer), 1 μ l *Taq* Polymerase와 1 μ l의 GSP2(10 uM, gene specific primer)을 첨가하여 만들었다. 이를 94 $^{\circ}$ C 25초, 72 $^{\circ}$ C 3분으로 5 cycles을, 94 $^{\circ}$ C 25초, 67 $^{\circ}$ C 3분으로 20 cycle을, 마지막으로 반응을 안정하게 종결하기 위해 67 $^{\circ}$ C에서 7분을 수행하였다. 실험에 사용된 gene specific primer는 다음과 같다. *comA* 유전자의 upstream으로 처음 genome walking 할 때 사용한 primer는 GWI, GWI의 upstream으로 genome walking 할 때 사용한 primer는 GWII로 표기하였다.

For GWI

GSP1 : 5'-TAG ATT CGG TTT TGC TGA TGG CGC CAT G-3' (28 mers)

GSP2 : 5'-GAT GCC GCT GAT GTC ATC ACC CAG ATT T-3' (28 mers)

For GWII

GSP1 ; 5'-TGC CCC GTT CCC CTA TTT TCA TTA-3'(24 mers)

GSP2 ; 5'-GCT AAT TGA TGA GAA TAC GGC TCC-3'(24 mers)

4) Genome walking PCR 산물의 Cloning.

증폭된 GWI, GWII 절편을 pGEM-T easy 벡터시스템을 이용하여 클로닝하였다. 반응액은 총 10 μ l로 하여 유전자의 PCR 산물 3 μ l (0.3 μ g), 5 μ l의 2 \times ligation buffer, 1 μ l (0.1 μ g)의 pGEM-Teasy 벡터, 1 μ l의 T4 DNA ligase (Promega Co., Madison, WI)를 혼합하여 4 $^{\circ}$ C 상온에서 12시간 동안 반응시켰다. 이를 *Escherichia coli*. DH5 α 에 CaCl₂를 이용한 방법으로 형질전환한 후 5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -galactopyranoside (X-gal)과 isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranoside (IPTG)가 첨가된 배지에서 blue/white colony selection을 통하여 재조합 유전자의 벡터가 삽입된 클론을 확인하였다

5) 염기서열 분석

클론된 GWI, GWII 부분의 절편의 염기서열은 ABI PRISM 3730 Genetic Analyzer를 이용하여 염기서열을 결정하고 분석하였다. SP6와 T7 promoter를 사용하여 분석한 염기서열을 통합하여 National Center for Biotechnology Information (NCBI, National Library of

Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, MD)에서 제공하는 Genbank database에서 염기 서열 정보의 상동성을 분석하였다.

6) PCR primers 제작 및 PCR

염기서열 분석된 GWI, GWII의 염기서열을 기초로 기존의 보고된 *B. subtilis*의 quorum sensing 유전자 중 발현 조절에 직접적인 영향을 미치고, JKK238 균주에 특이적으로 작용하는 extra-cellular pheromone인 *comX*를 분리해 내기 위한 polymerase chain reaction (PCR) primers를 제작하였으며 그 염기서열은 다음과 같다.

comX-F : 5'-ATG CAG GAA ATA GTA AAT TAT TTA-3' (24 mers)

comX-R : 5'-TCA TGA CGG TTT CCA ATA TAT CTC-3' (24 mers)

PCR은 SuperTaq(Super-Bio. Co., Seoul)를 이용하여 수행하였으며, PCR의 총 반응액은 10 μ l로 하여 1 μ l의 genomic DNA, 1 μ l의 10 \times Reaction buffer, 각 10 pmole의 primer set를 혼합하였다. 먼저 95 $^{\circ}$ C에서 3분간 주형 DNA를 변성시킨 후 95 $^{\circ}$ C 30초, 45 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 30초의 반응 사이클을 30회 반복 시행하였다. 이를 통하여 174 bps에 해당하는 *comX* PCR 산물을 0.8% agarose gel에서 전기영동을 수행하여 확인하였다.

7) 염기서열 분석

PCR을 통하여 분리한 *comX* 절편들의 염기서열은 ABI PRISM 3730 Genetic Analyzer를 이용하여 염기서열을 결정하고 분석하였다. SP6와 T7 promoter를 사용하여 분석한 염기 서열을 통합하여 National Center for Biotechnology Information (NCBI, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, MD)에서 제공하는 Genbank database에서 염기 서열 정보의 상동성을 분석하였다.

바. 분리한 유효 물질 발현 조절 유전자의 발현 벡터 개발 및 구축

1) 발현 벡터 개발

분리한 유효 물질 발현 조절 유전자의 발현을 위하여, Keio University의 Institute for Advanced Biosciences(Tsuruoka, Yamagata 997-0017, Japan)로부터 pHASH121 벡터를 분양받아 발현 벡터로 사용하였다. 벡터의 유전자 지도는 아래와 같다(Figure 2-2).

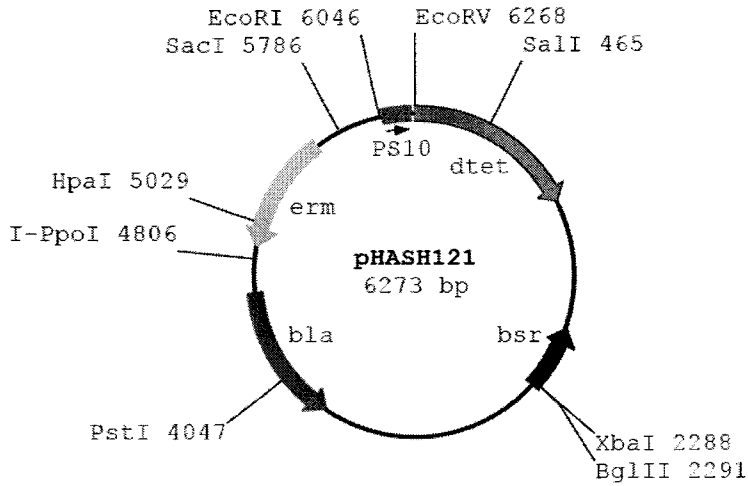


Figure 2-2. Genetic map of pHASH121 vector

2) 분리한 유효 물질 발현 조절 유전자의 발현 벡터 구축

가) PCR primers 제작 및 PCR

염기서열 분석된 *abrB*, *sigW*의 염기서열을 바탕으로 발현 벡터를 구축하기 위한 polymerase chain reaction (PCR) primers를 제작하였으며 그 염기서열은 다음과 같다.

abrBH-F : 5'-ATG TTT ATG AAA TCT ACT GGT ATC-3' (24 mers)

abrBH-R : 5'-TTA TTT TTG GTT TTG AAG CTG GTT-3' (24 mers)

sigWH-F : 5'-ATG GAA AAC CTG ATT AAA AAA AGA-3' (24 mers)

sigWH-R : 5'-TTA AAG ATC CCT CAA TTG TTT TCT-3' (24 mers)

PCR은 SuperTaq(Super-Bio. Co., Seoul)를 이용하여 수행하였으며, PCR의 총 반응액은 10 μ l로 하여 1 μ l의 genomic DNA, 1 μ l의 10 \times Reaction buffer, 각 10 pmole의 primer set를 혼합하였다. 먼저 95 $^{\circ}$ C에서 3분간 주형 DNA를 변성시킨 후 95 $^{\circ}$ C 30초, 45 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 30초의 반응 사이클을 30회 반복 시행하였다. 이를 통하여 *abrB* (291 bps), *sigW* (564 bps)에 해당하는 PCR 산물을 0.8% agarose gel에서 전기영동을 수행하여 확인하였다.

나) 발현 벡터의 준비

증폭된 *abrB*, *sigW*를 포함하는 절편들을 발현 벡터에 삽입하기 위하여, pHASH121 벡터를 T 벡터화 하였다.

다) 발현 벡터의 절단

반응액은 총 200 μ l로 하여 pHASH 벡터를 20 μ l (2 μ g), 20 μ l의 10 \times restriction buffer, 2 μ l (20 U)의 EcoRV (MBI fermentas, Lithuania), 158 μ l의 deionized water와 함께 37 $^{\circ}$ C에서 6시간 동안 반응시켜 완전히 절단하였다. 반응물을 organic extraction하여 정제한 후, 에탄올을 이용하여 침전시켜 11 μ l의 deionized water에 녹였다.

라) 절단 벡터 말단에 dideoxy-thymidine 첨가

반응액은 총 50 μ l로 하여 절단한 벡터 5 μ l (1 μ g), 10 μ l의 10mM dTTP, 5 μ l의 10 \times reaction buffer, 1 μ l의 Super Tag polymerase (2.5U), 24 μ l의 deionized water를 혼합하여 72 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응물을 organic extraction하여 정제한 후, 에탄올을 이용하여 침전시켜 10.5 μ l의 deionized water에 녹였다.

마) PCR 산물의 Cloning

증폭된 *abrB*, *comX*, *sigW* 를 포함하는 절편들을 준비된 pHASH121 발현 벡터에 삽입하기 위하여, ligation을 수행하였다. 반응액은 총 10 μ l로 하여 각각 유전자의 PCR 산물 3 μ l, 5 μ l의 2 \times ligation buffer, 1 μ l의 pHASH121 T 벡터, 1 μ l의 T4 DNA ligase (Promega Co., Madison, WI)를 혼합하여 4 $^{\circ}$ C 상온에서 12시간 동안 반응시켰다. 이를 *Escherichia coli*. DH5a에 CaCl₂를 이용한 방법으로 형질전환한 후 ampicilin (50 ng / ml)이 포함된 배지에서 antibiotic selection을 통하여 재조합 유전자의 발현벡터가 삽입된 클론을 확인하였다.

사. 구축된 발현 벡터를 *Bacillus subtilis*로 형질전환하는 시스템 개발

1) Media change method

*Bacillus subtilis*는 영양소가 충분한 상태에서 그렇지 않은 상태로 환경이 변화할 때 starvation response들을 가지는데 그 중 competency를 띠는 일반적인 특성에 기인하여 확립된 방법이다. 이 방법은 *B. subtilis*가 생육하면서 필요한 N-source를 제한함으로써 N-source로서 외부의 유전자를 세포 내부로 취하는 원리이다. 기본적으로 필요한 시약 및 배지는 아래와 같다(Table 2-1). 우선, LB 배지 5 ml에 세포를 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 12 ~ 16시간 배양하였다. SP I media 25 ml에 이것을 1 ml 접종하고, 37 $^{\circ}$ C 200 rpm에서 O.D (optical density) 1.17이 될 때까지 배양하였다. 다시 SP II media 45 ml에 이것을 5 ml 접종하여 37 $^{\circ}$ C 50 rpm으로 90분간 배양하였다. 배양된 세포를 냉각 후 6500 rpm에서 15분간 원심분리하여 세포를 얻어내고, 얻어진 세포에 resuspension solution을 넣어 현탁하였다. 이것을 200 μ l씩 1.5ml Eppendorf tube에 분주하고, plasmid를 20~40 μ l 첨가하였다. 이 혼합물을 4 $^{\circ}$ C에서 2분간 heat shock을 가한 후, test tube에 옮겨서 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양한 후 LB 배

지를 1 ml 첨가하고, 37°C에서 90분간 다시 배양하였다. 그리고, 항생제가 포함된 배지에 spreading하여 37°C에서 12~16시간 배양하여 선별된 세포를 확인하였다.

Table 2-1. Reagents and media for transformation

Reagents & media	Composition	
SP salts	1× concentration	500ml
	0.2% (NH ₄) ₂ SO ₄	1.0g
	1.4% K ₂ HPO ₄	7.0g
	0.6% KH ₂ PO ₄	3.0g
	0.1% Na ₃ Citrate · 2H ₂ O	0.5g
	0.02% MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1g
CaCl ₂	100×concentration	50ml
	50mM CaCl ₂	0.37g
MgCl ₂	100×concentration	50ml
	250mM MgCl ₂	2.54g
Glucose	100×concentration	50ml
	50% Glucose	25g
Casamino acid / Yeast extract	100×concentration	50ml
	2% Casamino acids	1.0g
	10% Yeast extract	5g
SP I media (25ml)	SP salts (24.5ml) + 1/100 volume glucose (0.25ml) + 1/100 volume Casamino acids/Yeast extract (0.25ml)	
SP II media (50ml)	SP salt (49ml) + 1/100 volum CaCl ₂ (0.5ml) + 1/100 volume MgCl ₂ (0.5ml)	
Resuspension solution	SP II media (5 ml) + 10% glycerol (550μl)	

2) 형질전환체의 검증

선별된 세포를 LB (Luria-Bertani) 배지에 erythromycin (10 ng/ml)을 첨가하여 배양하였다.

가) Genomic DNA의 분리

Genomic DNA의 분리는 앞에서 서술한 바와 같은 방법을 사용하였다.

나) PCR primer 제작 및 PCR

기존에 보고된 바에 의하면 *B. subtilis*의 형질전환은 벡터상태로 존재하는 확률보다 genomic DNA에 integration되는 확률이 훨씬 더 높은 것으로 알려져 있다. 이러한 근거를

바탕으로 벡터의 염기서열을 기초로 forward primer를 제작하여 각 목표유전자의 해당 reverse primer와 함께 PCR을 수행함으로써, 형질전환체를 1차적으로 선별하였다. 제작한 primer의 염기서열은 다음과 같다.

S121-F : 5'-AAG TCG GCA TGC ACG CAA CCA TTT-3' (24 mers)

PCR은 반복 수행을 통하여 조건을 확립하고 수행하였다. PCR은 SuperTaq (Super-Bio. Co., Seoul)을 이용하여 수행하였으며, PCR의 총 반응액은 10 μ l로 하여 1 μ l의 genomic DNA, 1 μ l의 10 \times Reaction buffer, 각 10 pmole의 primer set을 혼합하였다. 먼저 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 주형 DNA를 변성시킨 후 95 $^{\circ}$ C 30초, 45 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 30초의 반응 사이클을 30회 반복 시행하였다. 이 실험을 통한 PCR 산물을 0.8% agarose gel에서 전기영동을 수행하여 확인하였다.

다) 목표유전자의 발현을 확인하기 위한 RT-PCR

배양된 세포로부터 Easy-Blue (Intron. Co., Sungnam, Kyungki-do)를 이용하여 total RNA를 추출하였으며, 이 RNA를 주형으로 하고 gene specific primer를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. PCR은 SuperTaq (Super-Bio, Co., Seoul)을 이용하여 수행하였으며, 총 반응액은 10 μ l로 하여 1 μ l의 total RNA, 1 μ l의 10 \times Reaction buffer, 각 20 pmol의 primer set을 혼합하였다. 먼저 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 주형 DNA를 변성시킨 후 95 $^{\circ}$ C 30초, 45 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 30초의 반응 사이클을 30회 반복 시행하였다. 이 실험을 통한 PCR 산물을 0.8% agarose gel에서 전기영동을 수행하여 확인하였다.

2. 연구 결과

가. Library Screening을 위한 iturin A ORF의 부분 클론 제작

1) Genomic DNA의 분리

B. subtilis JKK238 genomic DNA는 G-DEX™ (Intron Co., Korea)를 이용하여 분리하였으며, 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다(Figure 2-3).

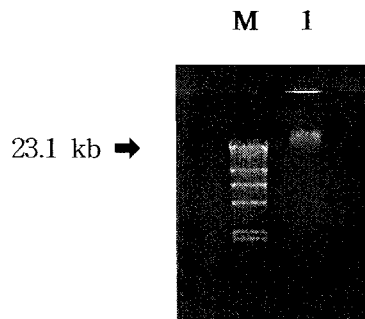


Figure 2-3. Electrophoresis patterns of genomic DNAs isolated from *B. subtilis* JKK238. M, lambda/HindIII DNA size marker; lane 1, Genomic DNAs from *B. subtilis* JKK238.

2) PCR primer 제작 및 PCR

Bacillus subtilis 중에서 생산되는 강력한 항 진균력을 가지는 iturin은 nonribosomally synthesized lipopeptide로서 4개의 ORF(open reading frame)로 구성되어 있다. PCR을 통하여 각각 약 870 bps와 800 bps에 해당하는 *itu B*, *itu C* PCR 산물을 0.8% agarose gel에서 전기영동을 수행하여 확인할 수 있었다(Figure 2-4).

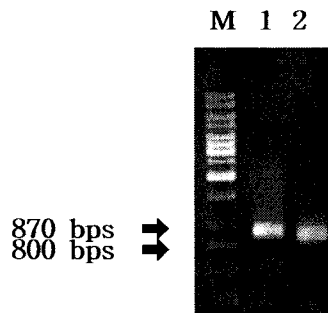


Figure 2-4. Electrophoresis patterns of PCR products amplified with iturin-specific primers (*ituBF*, *ituBR*, *ituCF* and *ituCR*). The expected molecular mass of the PCR products are each 870 and 800bp. M, 1Kb ladder (DNA Size marker), lane 1, PCR product of *itu B*; lane 2, PCR product of *itu C*.

3) PCR 산물의 Cloning

pGEM-T 벡터시스템을 이용하여 PCR 산물을 cloning하였으며 *E. coli* DH5a로 형질전환 한 후 blue/white colony selection을 통하여 재조합 유전자의 벡터가 삽입된 클론을 확인하였다(Figure 2-5).

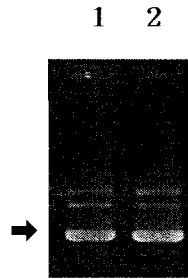


Figure 2-5. Electrophoresis patterns of iturin partial gene-harboring plasmid (pGEM-ituB,C) lane 1, pGEM-ituB (3.87 kbps); lane 2, pGEM-ituC (3.8 kbps).

4) 염기서열 분석

PCR을 통하여 분리한 irutin의 부분 유전자의 염기서열은 SP6와 T7 promoter를 사용하여 분석한 염기 서열을 통합하여 *itu B*와 *itu C*의 상동성을 분석결과는 다음과 같고 *itu B*와는 92%, *itu C*와는 97.5%의 상동성을 가지고 있는 것으로 확인되었다. 이를 협동과제에 제공하여 Library Screening에 사용할 probe로써 사용하도록 하였다.

© *ituB* Sequence

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
deduced	CCCGATCATGAAACCGTCATGTTGGAAATCAGACACTGACTTATCSTCAGCTGAAATGAGCGTCCAAATCAGCTGGCCGCATCCTTCAGATAGGGGGCTGCACATGATCAGGTTGTACCGTTCTC													
Consensus	CCCGATCATGAAACCGTCATGTTGGAAATCAGACACTGACTTATCSTCAGCTGAAATGAGCGTCCAAATCAGCTGGCCGCATcCTTCAGATAGGGGGCTGCACATGATCAGGTTGTACCGTTCTC													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
deduced	ACGGATCGCTCAGCAATGATGATCAGCCTTTAGCCATATTAAAGCCGCGGCGACATTTCTTCCATATGATCGGAGCTTCCGAAAHACGCGCGGCTTTATGCTGAHAACAGCGGTCGCGATG													
Consensus	ACGGATCGCTCAGCAATGATGATCAGCCTTTAGCCATATTAAAGCCGCGGCGACATTTCTTCCATATGATCGGAGCTTCCGAAAHACGCGCGGCTTTATGCTGAHAACAGCGGTCGCGATG													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
deduced	TGCCTTTGACCTTGTGACGGCCAGCTATTTCCGCGCTTTTGAAGGAGAAACCCCTTAACTTATGATATCCGATGATATATCAGGGGAGAGCAAGCAATCTTAATCTTTCTGCTCGAANA													
Consensus	TGCCTTTGACCTTGTGACGGCCAGCTATTTCCGCGCTTTTGAAGGAGAAACCCCTTAACTTATGATATCCGATGATATATCAGGGGAGAGCAAGCAATCTTAATCTTTCTGCTCGAANA													
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
deduced	ATGATTTAAATGATGTTTATTACACCGTTAAGCCACAGCGGCGAGCAAGGATTCAGCTGAGCCCAAGCCGAAATGAGGATTTTCGCTAATAGCAAGTTCATACGCAATTCGCTTTGAC													
Consensus	ATGATTTAAATGATGTTTATTACACCGTTAAGCCACAGCGGCGAGCAAGGATTCAGCTGAGCCCAAGCCGAAATGAGGATTTTCGCTAATAGCAAGTTCATACGCAATTCGCTTTGAC													
	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
deduced	AAGAGTCTGCAATTTTCGCGATAGCTTAAATGCTGCTAICAGAAATATTCGCGGCTTCAGAGCGAGAGACCTCTTATATCGCCGATAGGCAAAACGTCACATACCTCAGCAATGAA													
Consensus	AAGAGTCTGCAATTTTCGCGATAGCTTAAATGCTGCTAICAGAAATATTCGCGGCTTCAGAGCGAGAGACCTCTTATATCGCCGATAGGCAAAACGTCACATACCTCAGCAATGAA													
	651	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780
deduced	TTTGTGACAGACGACGGGATACAAACAGCATTCCTCCGACAGGCTTCCTTAAAGCTCCTTGCCTCAGAGAAACATATTTGAAACCTTTCCGCGTGCCTGATCATCTGCTCAGAGAACAG													
Consensus	TTTGTGACAGACGACGGGATACAAACAGCATTCCTCCGACAGGCTTCCTTAAAGCTCCTTGCCTCAGAGAAACATATTTGAAACCTTTCCGCGTGCCTGATCATCTGCTCAGAGAACAG													
	781	790	800	810	820	830	840	850	860	870	880	890693		
deduced	CTCATCTAACAAGATATGCTGCTGACATCTGCGACGCTCAAGTCACTTGCATATATATGCGCGCTCAGAGACGATGTTGTGACCATGTATACCTGATCTGAT													
Consensus	CTCATCTAACAAGATATGCTGCTGACATCTGCGACGCTCAAGTCACTTGCATATATATGCGCGCTCAGAGACGATGTTGTGACCATGTATACCTGATCTGAT													

© ituC Sequence

```

1      10     20     30     40     50     60     70     80     90     100    110    120    130
deduced ATCTGACCATGACGACCAACCCCAATGSCCGCTATCTGGTTCCTGGTGGARTTGAATCCCTTTATACAAATACACGGGGATGAGGGAGTGGATTACAGGGGCTCCACCTTTGAGAGCGAA
ituC    ATCTGACCATGACGACCAACCCCAATGSCCGCTATCTGGTTCCTGGTGGARTTGAATCCCTTTATACAAATACACGGGGATGAGGGAGTGGATTACAGGGGCTCCACCTTTGAGAGCGAA
Consensus ATCTGACCATGACGACCAACCCCAATGSCCGCTATCTGGTTCCTGGTGGARTTGAATCCCTTTATACAAATACACGGGGATGAGGGAGTGGATTACAGGGGCTCCACCTTTGAGAGCGAA

131    140    150    160    170    180    190    200    210    220    230    240    250    260
deduced CTGATGAGATCTTCGTCACACCTGCTCATGTTAATCAACAGCATATCAATTCCTGCGAGTACGTTTTAATCATATATCCATGAATTGAACATACGCTGACGAGCGATCTTATATCAGGAGCTTC
ituC    CTGATGAGATCTTCGTCACACCTGCTCATGTTAATCAACAGCATATCAATTCCTGCGAGTACGTTTTAATCATATATCCATGAATTGAACATACGCTGACGAGCGATCTTATATCAGGAGCTTC
Consensus CTGATGAGATCTTCGTCACACCTGCTCATGTTAATCAACAGCATATCAATTCCTGCGAGTACGTTTTAATCATATATCCATGAATTGAACATACGCTGACGAGCGATCTTATATCAGGAGCTTC

261    270    280    290    300    310    320    330    340    350    360    370    380    390
deduced CCTTGTATTAATGCGCGAGCCTGAGGCTGAGCTACCAATGCAATCATTTGCCATCATCCATACAGTCGTTTACATAGCAATTCATCTGTATGTTTCATAGAACGGCTGCTGCAGATGCTTT
ituC    CCTTGTATTAATGCGCGAGCCTGAGGCTGAGCTACCAATGCAATCATTTGCCATCATCCATACAGTCGTTTACATAGCAATTCATCTGTATGTTTCATAGAACGGCTGCTGCAGATGCTTT
Consensus CCTTGTATTAATGCGCGAGCCTGAGGCTGAGCTACCAATGCAATCATTTGCCATCATCCATACAGTCGTTTACATAGCAATTCATCTGTATGTTTCATAGAACGGCTGCTGCAGATGCTTT

391    400    410    420    430    440    450    460    470    480    490    500    510    520
deduced ATTTCAAGTTTGCATGAGTGAAGACTTGATTCACCTAATATATGTTTAAAGACAGCTATGACFCGTCAGTATATGATGCAGGTGCTCGGACATTAAGCCGG-TATTTCTGTCATATTATTCA
ituC    ATTTCAAGTTTGCATGAGTGAAGACTTGATTCACCTAATATATGTTTAAAGACAGCTATGACFCGTCAGTATATGATGCAGGTGCTCGGACATTAAGCCGG-TATTTCTGTCATATTATTCA
Consensus ATTTCAAGTTTGCATGAGTGAAGACTTGATTCACCTAATATATGTTTAAAGACAGCTATGACFCGTCAGTATATGATGCAGGTGCTCGGACATTAAGCCGG-TATTTCTGTCATATTATTCA

521    530    540    550    560    570    580    590    600    610    620    630    640    650
deduced GCCTGACCTCCCCTCGGCCAGGTGGAATTTTGCAGATCCGAGACACATACCTCTCTGTCGACATCAAACTCCAAACTGAAATTCGCGCGATAGAGCGTTTATCAGTTATTCGAGAGACAG
ituC    GCCTGACCTCCCCTCGGCCAGGTGGAATTTTGCAGATCCGAGACACATACCTCTCTGTCGACATCAAACTCCAAACTGAAATTCGCGCGATAGAGCGTTTATCAGTTATTCGAGAGACAG
Consensus GCCTGACCTCCCCTCGGCCAGGTGGAATTTTGCAGATCCGAGACACATACCTCTCTGTCGACATCAAACTCCAAACTGAAATTCGCGCGATAGAGCGTTTATCAGTTATTCGAGAGACAG

651    660    670    680    690    700    710    720    730    740    750    760    770    780
deduced ATGAAACGACACCCGGATCAGGACGCGGTATTTACGGAGAAAGCTATTCACATATGTCAGCTCAATGACGTCGCAATTCATCCCGACCTTAGGAAAGAGGGGCTAAGACGCGCCGCTCA
ituC    ATGAAACGACACCCGGATCAGGACGCGGTATTTACGGAGAAAGCAATTCACATATGTCAGCTCAATGACGTCGCAATTCATCCCGACCTTAGGAAAGAGGGGCTAAGACGCGCCGCTCA
Consensus ATGAAACGACACCCGGATCAGGACGCGGTATTTACGGAGAAAGCAATTCACATATGTCAGCTCAATGACGTCGCAATTCATCCCGACCTTAGGAAAGAGGGGCTAAGACGCGCCGCTCA

781    790    800    807
deduced CTGCGATTATCTGCGTACATGAGTTGG
ituC    CTGCGATTATCTGCGACATGAGATCG
Consensus CTGCGATTATCTGCGACATGAGATCG
    
```

나. RT-PCR을 통한 iNOS, COX-2의 발현량 측정

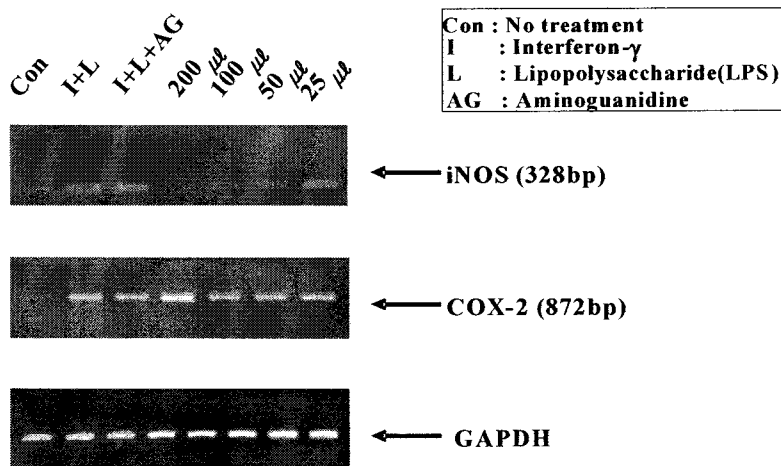


Figure 2-6. JKK238 Culture broth를 JKK238의 배양액을 자체를 LPS와 IFN- γ 로 iNOS를 induction시킨 RAW264.7 cell에 처리하여 mRNA level을 측정하는 RT-PCR을 수행한 결과 iNOS의 mRNA level이 dose-dependent하게 감소함을 알 수 있었다. 그러나 COX-2 mRNA level에는 변화가 없었다. 이 결과로 인해 JKK 238 culture broth에 있는 물질이 gene transcription level에서 iNOS mRNA level을 감소시킴을 알 수 있었다.

다.. COX-2 저해 효과 검증

COX 반응이 끝난 후 450nm에서 optical density (OD)를 측정한 결과는 아래와 같이 IFN- γ (10U/ml)+LPS(1 μ g/ml)를 처리해 iNOS를 유도 했을 때는 251.094 pg, 여기에 AG으로 iNOS 유도를 저해 했을시는 282.365 pg, *Bacillus subtilis* JKK238의 배양 상층액 10 μ l를 처리했을 시는 282.365 pg, 50 μ l를 처리했을 시에는 241.145 pg, 200 μ l 처리시는 280.944 pg의 prostaglandin-E2가 나온 것으로 추정된다. 이는 iNOS와 prostaglandin-E2와는 직접적인 관련이 없으므로 *Bacillus subtilis* JKK238의 배양 상층액에는 iNOS 저해 효과에는 관련되지만 COX-2 저해 효과에는 관련이 없는 것으로 사료된다(Figure 2-7).

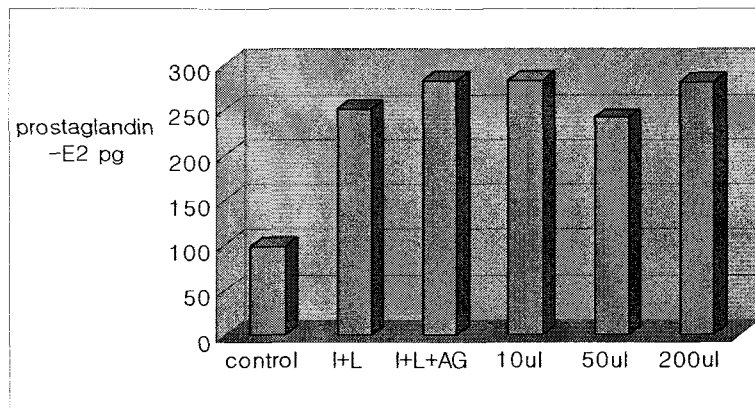


Figure 2-7. Cox-2 Inhibitory effect control, only raw cell; I+L, raw cell+IFN- γ (10 U/ml) +LPS(1 μ g/ml); I+L+AG, raw cell+IFN- γ (10 U/ml)+LPS(1 μ g/ml)+AG(100 μ M); 10 μ l, I+L fraction+10 μ l of supernatant of *Bacillus subtilis* JKK238 culture medifum for 36hrs.; 50 μ l, I+L fraction+50 μ l of supernatant of culture medifum; 200 μ l, I+L fraction+200 μ l of culture medium

라. *Bacillus subtilis* JKK238 균주의 유효 물질의 발현 조절 인자 탐색 및 유전자 분리

1) Genomic DNA의 분리

Genomic DNA의 분리는 앞에서 서술한 방법으로 준비하였다.

2) PCR primer 제작 및 PCR

기존의 보고된 *B. subtilis*의 발현 조절 인자들을 검색하여, *sigW*, *abrB*, quorum sensing 유전자들(*comQ*, *comX*, *comP*, *comA*)을 타겟으로 정했다., PCR을 통하여 667 bps (*sigW*), 646 bps (*comA*) 그리고 349 bps (*abrB*)에 해당하는 PCR 산물을 0.8% agarose gel에서 전기영동을 수행하여 확인하였다(Figure 2-8).

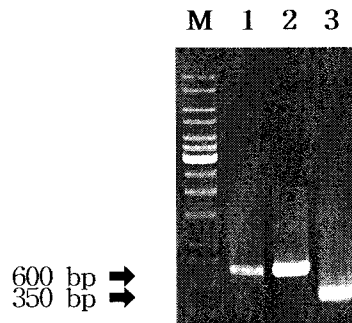


Figure 2-8. Electrophoresis patterns of amplified regulator of *B. subtilis* JKK238. M, 1 kb ladder; lane 1, PCR product of *sigW*; lane 2, PCR product of *comA*; lane 3, PCR product of *abrB*.

3) PCR 산물의 Cloning.

pGEM-T easy 벡터시스템을 이용하여 PCR 산물을 cloning하였으며 *E. coli* DH5a 로 형질전환 한 후 blue/white colony selection을 통하여 재조합 유전자의 벡터가 삽입된 클론을 확인하였다(Figure 2-9).

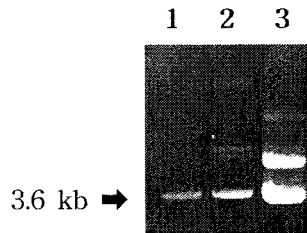


Figure 2-9. Electrophoresis patterns of regulators containing gene-harboring plasmid (pGEM-*sigW*, *comA* and *abrB*) lane 1, pGEM-*sigW* (3.6 kb); lane 2, pGEM-*comA* (3.68 kb); lane 2, pGEM-*abrB* (3.4 kb).

4) 염기서열 분석 및 염기서열에서 추출한 단백질의 3차 구조 예상

PCR을 통하여 분리한 *sigW*, *comA*, *abrB*를 포함한 DNA 절편 염기서열은 SP6와 T7 promoter를 사용하여 분석한 염기 서열을 통합한 결과는 다음과 같다. 상동성을 검사해 본 결과 *sigW*는 82.6 %, *comA*는 80.6%, *abrB*는 95%로 나타났다. 확실한 분석을 위해 deduced amino acid의 상동성을 분석해 보았으며, 이는 *sigW*는 95.2 %, *comA*는 79.4%, *abrB*는 99%로 나타났다. 이를 통하여 원하는 유전자들이 cloning 되었음을 재차 확인하였으며, 이 정보를 기초로 정말 DNA binding motif를 가지고 DNA에 직접 결합할 수 있는지 확인하기 위하여 단백질 3차 구조를 웹 상에서 제공하는 서비스를 이용하여 예측해 보았다.

◎ *sigW* sequence

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	
expected	CCITTTGAAACGAGCTCGTATACATACAGACCAGGCGGTGAGG-CAGAGGTAGATTAAT-ATGGAAATGATGATTAAANAAAGATTAACAGACTCAANAAAGCCGACCGATGCATTTCGGACATCGT														
cont.ig	CCITTTGAAACGAGCTCGTATACATACAGACCAGGCGGTGAGG-CAGAGGTAGATTAAT-ATGGAAATGATGATTAAANAAAGATTAACAGACTCAANAAAGCCGATCAAAATGCGTTTCGAGAAATCGT														
Consensus	CCITTTGAAACGAGCTCGTATACATACAGACCAGGCGGTGAGG-CAGAGGTAGATTAAT-ATGGAAATGATGATTAAANAAAGATTAACAGACTCAANAAAGCCGATCAAAATGCGATTTCGAGAAATCGT														
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	
expected	AGATATTACAAAGATTAATTTATCAGCTTCTGCTACCGTATGCTTGGCAATGTGCTATGAGGCGAGGATATGACAGAGAGCTTTCATCAGAGCTACCTAATATCGACGTTTGTATATACCGG														
cont.ig	AGATATTACAAAGATTAATTTATCAGCTTCTGCTACCGTATGCTTGGCAATGTGCTATGAGGCGAGGATATGACAGAGAGCTTTCATCAGAGCTACCTAATATCGACGTTTGTATATACCGG														
Consensus	AGATATTACAAAGATTAATTTATCAGCTTCTGCTACCGTATGCTTGGCAATGTGCTATGAGGCGAGGATATGACAGAGAGCTTTCATCAGAGCTACCTAATATCGACGTTTGTATATACCGG														
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	
expected	AAATTTTCACCTTGGCTTTATCGAATCGGACCAATTTGACCAATGACCGCATTCGCAAAAGAGAGCCGGATTATTACCTCGACGCAAGGTTGGCTGGTACGGAGGCTTGACCATGTATTCGAATCG														
cont.ig	AAATTTTCACCTTGGCTTTATCGAATCGGACCAATTTGACCAATGACCGCATTCGCAAAAGAGAGCCGGATTATTACCTCGACGCAAGGTTGGCTGGTACGGAGGCTTGACCATGTATTCGAATCG														
Consensus	AAATTTTCACCTTGGCTTTATCGAATCGGACCAATTTGACCAATGACCGCATTCGCAAAAGAGAGCCGGATTATTACCTCGACGCAAGGTTGGCTGGTACGGAGGCTTGACCATGTATTCGAATCG														
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520	
expected	TCGAGATGGTGTATTGCTGAGAGATCGAGTTGTATCGTGGAGCTCTAAACACGATACAGAGGAGAAATTTAAGCTTCTGACAAATACAGAGAGCTCATGATTAAGTATATTGACGACCTCTC														
cont.ig	TCGAGATGGTGTATTGCTGAGAGATCGAGTTGTATCGTGGAGCTCTAAACACGATACAGAGGAGAAATTTAAGCTTCTGACAAATACAGAGAGCTCATGATTAAGTATATTGACGACCTCTC														
Consensus	TCGAGATGGTGTATTGCTGAGAGATCGAGTTGTATCGTGGAGCTCTAAACACGATACAGAGGAGAAATTTAAGCTTCTGACAAATACAGAGAGCTCATGATTAAGTATATTGACGACCTCTC														
	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650	
expected	ATTAAATGAAATCGGGGATTCATACATTCCTGTGGGACTGTGAAACCGCGATTACAGAGGCGAGAGGCTCTTAAAGAAATTAAGGATCTTTAAGTGGGTTGATGAAATGACTGTCTCTGA														
cont.ig	ATTAAATGAAATCGGGGATTCATACATTCCTGTGGGACTGTGAAACCGCGATTACAGAGGCGAGAGGCTCTTAAAGAAATTAAGGATCTTTAAGTGGGTTGATGAAATGACTGTCTCTGA														
Consensus	ATTAAATGAAATCGGGGATTCATACATTCCTGTGGGACTGTGAAACCGCGATTACAGAGGCGAGAGGCTCTTAAAGAAATTAAGGATCTTTAAGTGGGTTGATGAAATGACTGTCTCTGA														
	651	660	666												
expected	ACAAATTTGCGAGCTT														
cont.ig	ACAAATTTGCGAGCTT														
Consensus	ACAAATTTGCGAGCTT														

82.6% identity (amino acid 95.2%)



© *comA* sequence

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
confi	ATGAAAAGATAC TAGT GATT GATGAT CATE CGGC TGTCAT GAGAGG CACCAG AC GATTC TGGAAAC GGCACG C GATCTT CTCTGTC GATTGCC TCGTCT GATG CCGAGTAC AATTCG TCTCCGGC													
expected	ATGAAAAGATAC TAGT GATT GATGAT CATE CGGC TGTCAT GAGAGG CACCAG AC GATTC TGGAAAC GGCACG C GATCTT CTCTGTC GATTGCC TCGTCT GATG CCGAGTAC AATTCG TCTCCGGC													
Consensus	ATGAAAAGATAC TAGT GATT GATGAT CATE CGGC TGTCAT GAGAGG CACCAG AC GATTC TGGAAAC GGCACG C GATCTT CTCTGTC GATTGCC TCGTCT GATG CCGAGTAC AATTCG TCTCCGGC													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
confi	ATGATTTT CAGCTTAC GATCTCAT ATTAAT G GATTTA ATCTGG GTGATG ACATCAG CCGCAT CCGAGCTT CCGA GAAATCTT AAGAGG AATCCCTCT CTTGTA AATCATTG TCTACAG CCGTATGA													
expected	ATGATTTT CAGCTTAC GATCTCAT ATTAAT G GATTTA ATCTGG GTGATG ACATCAG CCGCAT CCGAGCTT CCGA GAAATCTT AAGAGG AATCCCTCT CTTGTA AATCATTG TCTACAG CCGTATGA													
Consensus	ATGATTTT CAGCTTAC GATCTCAT ATTAAT G GATTTA ATCTGG GTGATG ACATCAG CCGCAT CCGAGCTT CCGA GAAATCTT AAGAGG AATCCCTCT CTTGTA AATCATTG TCTACAG CCGTATGA													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
confi	GGTTGAGAT ATTTT GAGGAT C C ATCCG CCGGGCTGC ATG GCGCCAT CAGC A A A C C G A T C T A A G A G A A A T C A T G C A A T A C A T A T C A T G T G A A C G G C A G A T T T A G T G A T T C T C C													
expected	GGTTGAGAT ATTTT GAGGAT C C ATCCG CCGGGCTGC ATG GCGCCAT CAGC A A A C C G A T C T A A G A G A A A T C A T G C A A T A C A T A T C A T G T G A A C G G C A G A T T T A G T G A T T C T C C													
Consensus	GGTTGAGAT ATTTT GAGGAT C C ATCCG CCGGGCTGC ATG GCGCCAT CAGC A A A C C G A T C T A A G A G A A A T C A T G C A A T A C A T A T C A T G T G A A C G G C A G A T T T A G T G A T T C T C C													
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
confi	TATTTCAAG CAGCTGAT GACCTCAG C A A A A A C A A A A C G T C T T C C C T C A A G T G A G C A G G A T C G T T A A C C C G A G A G C G C A T A T T C T C C A A G G T C G A A A A G G T T G A C A A T C A G A A A													
expected	TATTTCAAG CAGCTGAT GACCTCAG C A A A A A C A A A A C G T C T T C C C T C A A G T G A G C A G G A T C G T T A A C C C G A G A G C G C A T A T T C T C C A A G G T C G A A A A G G T T G A C A A T C A G A A A													
Consensus	TATTTCAAG CAGCTGAT GACCTCAG C A A A A A C A A A A C G T C T T C C C T C A A G T G A G C A G G A T C G T T A A C C C G A G A G C G C A T A T T C T C C A A G G T C G A A A A G G T T G A C A A T C A G A A A													
	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	646
confi	TCGAGATG CCGTTCAC TT AAGC A G C G G T C G A T T G A A T A C A G C T G A C A T C C A T T T A A T A A G C T G A A T G C G G C T C C C A A C T G A A G C G T G A T C G C A A A T C A G A C G G T A C T T T A A													
expected	TCGAGATG CCGTTCAC TT AAGC A G C G G T C G A T T G A A T A C A G C T G A C A T C C A T T T A A T A A G C T G A A T G C G G C T C C C A A C T G A A G C G T G A T C G C A A A T C A G A C G G T A C T T T A A													
Consensus	TCGAGATG CCGTTCAC TT AAGC A G C G G T C G A T T G A A T A C A G C T G A C A T C C A T T T A A T A A G C T G A A T G C G G C T C C C A A C T G A A G C G T G A T C G C A A A T C A G A C G G T A C T T T A A													



80.6% identity (amino acid 79.4%)

© *abrB* sequence

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
expected	TTGGAGGAGATG TTTATG AATCTACTGG TATTGTCG TAAAGT T GATG AATAGG CAGCTGATG TATTCCTATCG AACTGCGTCTACTCT TGGAAATCCG CAGAAAGATGCTCT TGAATCTATGT													
cont.ig	TTGGAGGAGATG TTTATG AATCTACTGG TATTGTCG TAAAGT T GATG AATAGG CAGCTGATG TATTCCTATCG AACTGCGTCTACTCT TGGAAATCCG CAGAAAGATGCTCT TGAATCTATGT													
Consensus	TTGGAGGAGATG TTTATG AATCTACTGG TATTGTCG TAAAGT T GATG AATAGG CAGCTGATG TATTCCTATCG AACTGCGTCTACTCT TGGAAATCCG CAGAAAGATGCTCT TGAATCTATGT													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
expected	TGATGATG A A A A A T A T C C T T A A A A A T A T A A C C A A C A T G A C T T G C C A A G T A C T G G T G A G T T C T G A T G A T A C C T T A A A C T T G C A G G C G T A A T T G G T C T T A G T A A A A G C G C T G A G C A A													
cont.ig	TGATGATG A A A A A T A T C C T T A A A A A T A T A A C C A A C A T G A C T T G C C A A G T A C T G G T G A G T T C T G A T G A T A C C T T A A A C T T G C A G G C G T A A T T G G T C T T A G T A A A A G C G C T G A G C A A													
Consensus	TGATGATG A A A A A T A T C C T T A A A A A T A T A A C C A A C A T G A C T T G C C A A G T A C T G G T G A G T T C T G A T G A T A C C T T A A A C T T G C A G G C G T A A T T G G T C T T A G T A A A A G C G C T G A G C A A													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350				
expected	ATCATCAG C A A A T C C A A A C C A G C T T C A A A C C T T A A A T A T C A T T C T T G T A C A A A A A C G T C T T G T T A T G C A C A G A A C G T T T T													
cont.ig	ATCATCAG C A A A T C C A A A C C A G C T T C A A A C C T T A A A T A T C A T T C T T G T A C A A A A A C G T C T T G T T A T G C A C A G A A C G T T T T													
Consensus	ATCATCAG C A A A T C C A A A C C A G C T T C A A A C C T T A A A T A T C A T T C T T G T A C A A A A A C G T C T T G T T A T G C A C A G A A C G T T T T													



95% identity (amino acid 99%)

마. Quorum sensing 유전자의 검색을 위한 genome walking

1) GenomeWalker Libraries 제작

분리되어진 genomic DNA를 *DraI*, *EcoRV*, *PvuII*, *StuI* 등 총 4개의 restriction enzyme으로 절단하여 정제한 후, genomewalker libraries를 제작하였다. 만들어진 libraries는 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다(Figure 2-10).

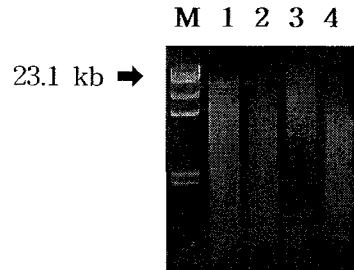


Figure 2-10. Electrophoresis patterns of genomewalker libraries digested genomic DNAs by *DraI*, *EcoRV*, *PvuII*, *StuI* M, lambda/HindIII DNA size marker; lane 1, genomewalker library (*DraI*); lane 2, genomewalker library (*EcoRV*); lane 3, genomewalker library (*PvuII*); genomewalker library (*StuI*)

2) Primary PCR 결과

제작된 Libraries와 GSP1 (10 uM, gene specific primer 1)을 이용하여 primary PCR을 수행하여 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다(Figure 2-11).

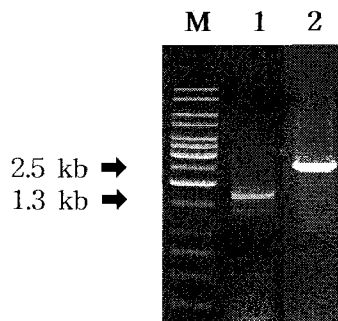


Figure 2-11. Electrophoresis patterns of primary PCR using gene specific primer 1 and adaptor primer from genomewalker libraries M, 1kb ladder; lane 1, GWI primary PCR product (*StuI*); lane 2, GWII primary PCR product (*EcoRV*)

3) Secondary PCR 결과

수행되어진 primary PCR 산물과 GSP2 (10 uM, gene specific primer 2)를 이용하여 secondary PCR을 수행하였다. 이는 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다 (Figure 2-12).

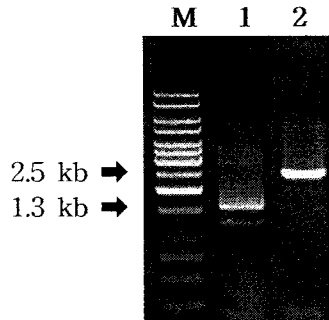


Figure 2-12. Electrophoresis patterns of secondary PCR using gene specific primer 2 and adaptor primer from genomewalker libraries M, 1kb ladder; lane 1, GWI secondary PCR product; lane 2, GWII secondary PCR product.

4) Genome walking PCR 산물의 Cloning.

증폭된 GWI, GWII 부분의 절편을 pGEM-T easy 벡터시스템을 이용하여 cloning 하였으며 *E. coli* DH5a로 형질전환 한 후 blue/white colony selection을 통하여 재조합 유전자의 벡터가 삽입된 클론을 확인하였다(Figure 2-13).

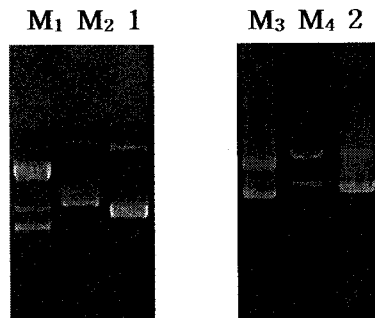


Figure 2-13. Electrophoresis patterns of plasmid containing upstream region of *comA*; lane M₁, 3 kb plasmid size marker; lane M₂, 4.5 kb plasmid size marker; lane 1, plasmid containing GWI (4.3 kb); lane M₃, 4.8kb plasmid size marker; lane M₄, 5.6kb plasmid size marker; lane 2, plasmid containing GWII (5.5kb)

5) 염기서열 분석

클론된 GWI 절편의 1272 bp 염기서열 그리고 GWII 절편의 2709 bp 염기서열은 sequencing을 통해 확인하였으며, GWI은 현재 밝혀진 Gene bank sequence와 약 80%의 상동성을 확인하였으며, *comA* 유전자로부터 1076 bp 올라간 *comP*의 부분 절편임을 확인하였다. GWII는 strain별로 상이하여, 현재 밝혀진 Gene bank sequence와는 상동성이 매우 낮음을 확인할 수 있었다.

© GWI sequence (1,272 bps)

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
contig	ACATAGGACGCGCTGGTCGACGCCCGGCTGATATAGCGTGTTTTAAATGATATAGGAA--AAATATAGGACCGATTCATCATATAGCT--GAAAC													
online	TACTATACCTGAGGCTCTCTAGTACCCAGCATATGTATATGAAATTCAGCGACGGAGCATTAGGCTATATGATGATGACCGGTHATATCATTCGAAAGATCTACAAAGATTTAGAA													
ConsensusACTaggggCtCgGgGfAaGtTAcCaga.....GfAcacagHfGcagfAagcTaaATGATaATGAGha.....AAhAcATfGcGhaaaagacTAcTaaAfhgghGctfGAAa													
contig	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
online	G--ACAGCTGAAATTCGCAAAATAGTTCAGGTCGATTAAGGCTTTTAAATGAAATAGGGAAACGGGCGAGTAAATCATACATGTACCTGCTGTTTATCATTTATGATATCCGAAATACCTCGGGATG													
Consensus	G...ACAcCGAAATaGaaAaAATaGTTChagIgaHHAAGGCTTfTaTGTAAATAGGGAAACGGGCGAGTAAATCATaCaIgaTAcTgTGTTTATCaAAATGAAATGCTCaAACTaAcCaagGaaG													
contig	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
online	AGATTTCTGGTAAAGACTTATCATCTACACAGATACGATCGAGGCTGCTTAAATCGAAGACTTATGATCATCTCGAAGATTTAAGAAACAGGAGACAAACCCGGCTCGCTCAAAA													
Consensus	AaaTTCTTGGCTAAAGACTTAgCaTCTAcAaAaTaaCGATCbaAaAcGTeaHHAATCbaAAGaaCTgATGhaTCATcTAgAAAGaaTAAaaAAACbaAaAcAAACCaGCTcGGCTCaAAaA													
contig	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
online	GGTATGTTTACGATCGAGAAAGACGCTTCGGATTTGGCCCGGATCTGCAATGATTCAGTCTCGAGGATTTGATTTCTTAAAGCCAGTGTGAGCTGTTCTGCGCGATTTAAAGAAAGAGAG													
Consensus	aCTcATGtAcAGATCGaAaAaAaAaCaCGTTCGgATCTcGCGCCGATCTcCaAGATTCaGtTcAgTcTgCAGGATTTGATTTCTTaaAaCaAGTGTGAGCTGTTCTGCGCGATTTAAAGAAaAaAG													
contig	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
online	---CTTGGCAGTTAGAGGTGCGAGGACAGCTTCATCAGATGATGAGCAGATGTCGATGTTATTTTGTATGACCCGGAGAGCTGCCATGAGCTCGACCTGAGCTGCTGATGATTTGGCTGGTCA													
Consensus	...CTgTGGCCAGgAaAGGTCAGGACAGCTTCaaCAGATGATGAGCAGATGTCgATGtATTCGATGACaAGGAGAGCTGCCATGAGCTGcCaCTcGAGCTgCTGATGATCTgGGCTGGTCA													
contig	651	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780
online	AGGCGATTCAGGCTTCACAGCAGCAGGACAGCTACCCGATTTACATCCGCTGATATACGGCCGATTCAGCGCCGCTGGATTTGATACGAGCTGATTTATACCGATTTACAGGATTT													
Consensus	AGGCGcTAcAGGCTTCCcCGCAGCAGCAGGACAGCTcCCGATTTAcATCCGCTGaATATACGGCCaGATTCAGCGCCGCTGgATCTGATAcCAGCTGAAATTTACCCGATcATTCaAaGAT													
contig	781	790	800	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910
online	TCTTTCAGACCCATGAGCAATTCAGGCGAATAGGCTGCTATATGCTGATCAGATTCAAATTAAGTGTCTGATATGAGACAGCGGTCGCGCTGATTCAGGAGAGAGGCGGCGAGAG													
Consensus	TCTGtTcAATCCGATCAGCACTTCAGGCGAGGATGCTGATATGCTcATcAGATTCaAAACAAATCGTCTTcATATGAGCAATGCGTAgGGTtGATCAGAAaAATATAGCAATCTGTCgAHCcAaTcAGCACTCaAGGCGAagGtGCTGATATGCTcATcAGATTCaAAAcAaAaTcATTCtGcATTAAGAAaAaAaCaAaCAG													
contig	911	920	930	940	950	960	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040
online	TCGATGACATGAGGCTTTCTGGATTAAGGAGCGCTTCCTGCGCTGACGCGGATGAAATTCAGACAGTGAACAGCAACGGTTTAAAGCGAATTAAGATGAAATTAACCAATTTATACCC													
Consensus	TCcATGAcATGAGGCTTTCTGGATTAAGGAGCGCTTCCTGCGCTGAcGCGGATGAAATTCAGAcAGTGAACAGCAACGGTTTAAAGCGAATTAAGATGAAATTAACCAATTTATACCC													
contig	1041	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170
online	AAATCGACTTGGCAGAGCCAGTCTTTTAAATGAAATGAAATGATGATTAAGGAGGAAACCAATGAAAGAAATACTAGTGTATGATTCACCCGCTGCTATGAAAGCCAGGAGATTTCTG													
Consensus	aaAATcGACTTGGcAGAGCCAGTCTTTTaaATGAAATGAAATGATGATTAAGGAGGAAACCAATGAAAGAAATAcTAgTGTATGATTCaCCCGCTGCTATGaaAGCCAGGAGATTTCTG													
contig	1171	1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
online	GAAACGACAGCAGATCTTCTGTCGATGCTCTAGTCTGATGCCAGTAAACAAATTCATCTCCGCGATGATTTTACGCTTACGATCTCGATTAATGATTAATCTGGTGTATGATACAGCGCA													
Consensus	GAAACGAcAcAGATCTCTGTCGATGCTCTAGTCTGATGCCAGTAAACAAATTCATCTCCGCGATGATTTTAcGCTTAcGATCTCGATTAATGATTAATCTGGTGTATGATAcAGCGCAAGCGCA													
contig	13081													
online	I-I													
Consensus	TCA													

6) PCR primers 제작 및 PCR

염기서열 분석된 GWI, GWII의 염기서열을 기초로 기존의 보고된 *B. subtilis*의 quorum sensing 유전자 중 발현 조절에 직접적인 영향을 미치고, JKK238 균주에 특이적으로 작용하는 extra-cellular pheromone인 *comX*를 목표로 정하고, polymerase chain reaction (PCR)을 통하여 174 bps에 해당하는 PCR 산물을 2.0% agarose gel에서 전기영동을 수행하여 확인하였다(Figure 2-14).

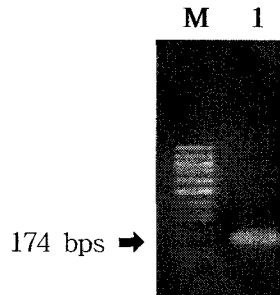


Figure. 2-14. Electrophoresis patterns of amplified *comX* of *B. subtilis* JKK238. M, 100 bps ladder; lane 1, PCR product of *comX*

7) PCR 산물의 Cloning.

증폭된 *comX*의 절편을 pHASH T 벡터 시스템을 이용하여 cloning하였으며, *E. coli* DH5α로 형질전환한 후 antibiotics selection을 통하여 재조합 유전자의 벡터가 삽입된 클론을 확인하였다(Figure 2-15).

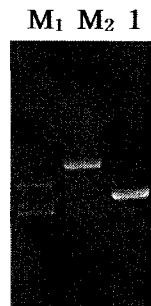


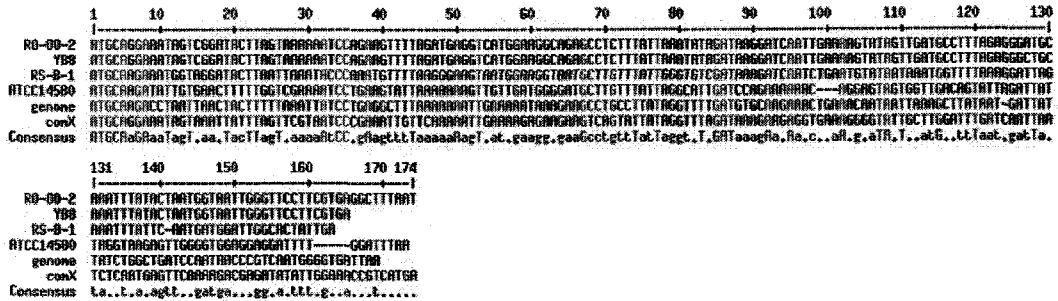
Figure 2-15. Electrophoresis patterns of plasmid containing of *comX*; lane M₁, 5.5 kb plasmid size marker; lane M₂, 8.6 kb plasmid size marker; lane 1, plasmid containing *comX* (6.4 kb)

8) *ComX* 유전자의 염기서열 분석

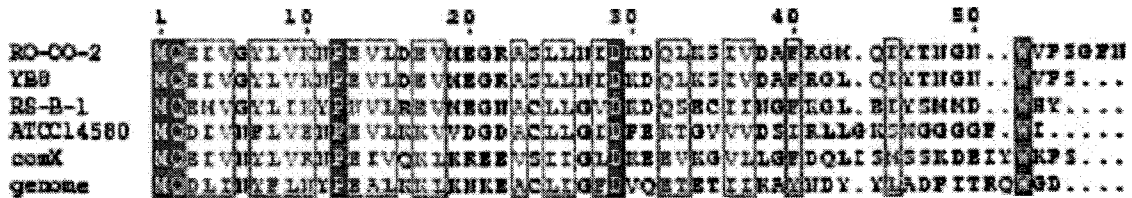
PCR을 통하여 분리한 *comX* 절편 염기서열은 SP6와 T7 promoter를 사용하여 분석한 염기 서열을 통합한 결과는 다음과 같다. 확실한 분석을 위해 deduced amino acid의 상동성을 분석해 보았으며, 염기서열 분석, amino acid분석 결과 예측한대로 균주 특이적인 매우

다양한 polymorphism을 보여주었다. 그러나, amino acids 분석에서 다른 균주에서 동정된 유전자에서 보여주는 보존된 amino acids 잔기들은 잘 보존되어 있음을 확인할 수 있었다.

◎ *comX* (174 bps)



◎ *ComX* (56 amino acids)



바. 분리한 유효 물질 발현 조절 유전자의 발현 벡터 개발 및 구축

1) 발현 벡터 개발

분리한 유효 물질 발현 조절 유전자의 발현을 위하여, Keio University의 Institute for Advanced Biosciences(Tsuruoka, Yamagata 997-0017, Japan)로부터 pHASH121 벡터를 분양받아 발현 벡터로 사용하였다.

2) 분리한 유효 물질 발현 조절 유전자의 발현 벡터 구축

염기서열 분석된 *abrB*, *sigW*의 염기서열을 바탕으로 PCR primers를 제작하였고, PCR을 통하여 각각 291 bps (*abrB*), 564 bps (*sigW*)에 해당하는 PCR 산물을 얻어 0.8% agarose gel에 전기영동을 수행하여 확인하였다(Figure 2-16)



Figure 2-16. Electrophoresis patterns of amplified *abrB*, *sigW*; lane M, 1 kb DNA ladder marker; lane 1, PCR product of *abrB* (291 bps); lane 2, PCR product of *sigW* (564 bps)

증폭된 *abrB*, *comX*, *sigW* 를 포함하는 절편들을 발현 벡터에 삽입하기 위하여, pHASH121 벡터를 T 벡터화 한 후, 증폭된 *abrB*, *comX*, *sigW* 를 포함하는 절편들을 클로닝하였으며, 이를 대장균 DH5a에 형질전환한 후 ampicilin이 포함된 배지에서 antibiotic selection을 통하여 재조합 유전자의 발현벡터가 삽입된 클론을 확인하였다(Figure 2-17).

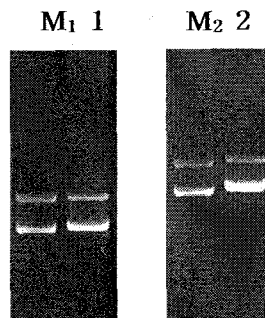


Figure 2-17. Electrophoresis patterns of plasmid containing of *abrB*, *sigW*; lane M₁, M₂, 6.4 kb plasmid size marker; lane 1, plasmid containing *abrB* (6.5 kb); lane 2, plasmid containing *sigW* (6.8 kb).

사. *Bacillus* 형질전환체의 선발

1) 형질전환체의 검증

가) Genomic DNA의 분리

B. subtilis 형질전환체의 genomic DNA는 G-DEX™ (Intron Co., Korea)를 이용하여 분리하였으며, 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다 (Figure 2-18).

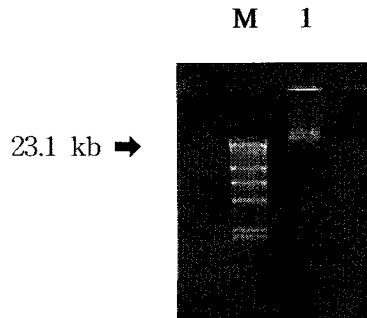


Figure 2-18. Electrophoresis patterns of genomic DNAs isolated from *B. subtilis* JKK238. M, lambda/HindIII DNA size marker; lane 1, Genomic DNAs from *B. subtilis* JKK238.

나) PCR primer 제작 및 PCR

B. subtilis 형질전환체에서의 genomic DNA를 이용한 PCR을 통하여 벡터 염기조각을 포함한 각각 363 bps (*comX*), 480 bps (*abrB*)와 753 bps (*sigW*)에 해당하는 PCR 산물을 0.8% agarose gel에서 전기영동을 수행하여 확인할 수 있었다 (Figure 2-19).

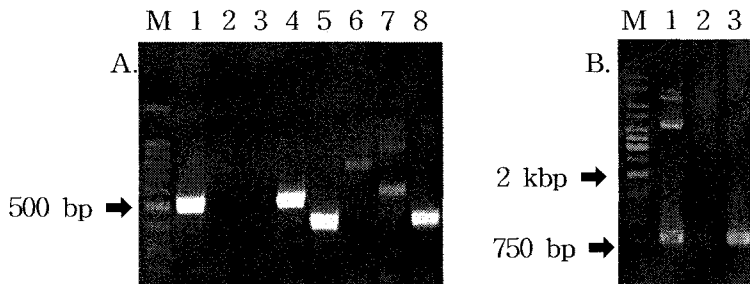


Figure 2-19. Electrophoresis patterns of amplified *abrB*, *comX* and *sigW*. A. PCR product of *abrB* and *comX*; lane M, 100bps DNA ladder marker; lane 1 ~ 4, PCR product of *abrB* (480 bps) - lane 1, positive control; lane 2, negative control (from JKK238); lane 3, negative control (from BEST2131); lane 4, *abrB* (from transformant); lane 5 ~ 8, PCR product of *comX* (363 bps) - lane 5, positive control; lane 6 negative control (from JKK238); lane 7, negative control (from BEST2131); lane 8, *comX* (from transformants). B. PCR product of *sigW* (753 bps); lane M, 1 kb DNA ladder marker; lane 1, positive control; lane 2, negative control (from BEST2131); lane 3, *sigW* (from transformant)

다) 목표유전자의 발현을 확인하기 위한 RT-PCR

B. subtilis 형질전환체로 부터의 total RNA를 이용한 RT-PCR을 통하여 각각 174 bps (*comX*), 291 bps (*abrB*)와 564 bps (*sigW*)에 해당하는 PCR 산물을 0.8% agarose gel에

서 전기영동을 수행하여 확인할 수 있었다 (Figure 2-20).

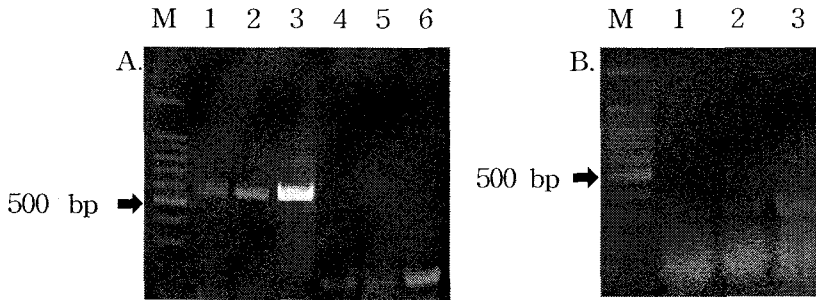


Figure 2-20. Electrophoresis patterns of transcribed *abrB*, *comX* and *sigW*. A. RT-PCR product of *sigW* and *comX*; lane M, 100bps DNA ladder marker; lane 1 ~ 3, RT-PCR product of *sigW* (564 bps) - lane 1, positive control (from JKK238) ; lane 2, negative control (from BEST2131); lane 3, *sigW* (from transformant); lane 4 ~ 6, RT-PCR product of *comX* (174 bps) - lane 4, positive control(from JKK238); lane 5, negative control (from BEST2131); lane 6, *comX* (from transformants). B. RT-PCR product of *abrB* (291 bps); lane M, 100 bps DNA ladder marker; lane 1, positive control (from JKK238); lane 2, negative control (from BEST2131); lane 3, *abrB* (from transformant)

협동과제 :

Bacillus 생리활성 물질 정제, 생합성 유전자의 분리 및 발현시스템 개발 (농업생명공학연구원 윤상홍)

1. 연구 수행 방법

가. *Bacillus* sp. JKK238균주의 동정 및 특성

본 실험의 공시균주로 사용된 JKK238균주는 아래와 같은 방법에 의해 선발되어 동정되었다. JKK238균주는 강경의 오젖에서 분리되었으며 강한 항균성과 항염증 활성을 나타내는 생리활성 물질을 분비하고 있다. 본 협동연구과제에서는 이 균주의 동정과 기타 특성에 대해 조사하였다.

1) 공시균주의 선발

본 실험의 선발 대상균주들은 한국 농용미생물보존센터(KACC)에 임시 보존되어 있는 2,000여 주를 사용하였다. 이들 균주들은 다양한 환경의 경작지 토양 및 전국 각지에서 수집한 젓갈에서 채취, 분리된 것이다. 균주의 1차 선발은 아래에 공시한 곰팡이균을 지시병원균으로 PDA고체배지에서 대치배양한 뒤 1 cm이상의 균사 저지대를 보여주는 균들을 선발하였고 이들 선발주들을 각 50 ml의 LB 액체배지에서 30℃ 48시간 진탕배양한 후 원심분리하여 상등액을 모았다. 이 상등액을 80% ammonium sulfate 포화도로 염석되는 물질만을 투석한 후 각각의 항균력을 측정하여 최종적으로 항균력이 가장 뛰어난 JKK238을 선발하였다. 항균검정의 지시병원균으로는 다음 균주들을 사용하였다. *Botrytis cinerea*, *Cercospora* sp., *Fusarium oxysporum*, *Penicillium digitatum*, *Collectotrichum gloeosporioides*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Trichoderma* sp. 및 *Pyricularia oryzae*, *Streptomyces scabies*, *Erwinia amylovora* 등의 식물병원균과 *Listeria monocytogenes*와 같은 식중독균을 한국 농용미생물자원센터(KACC)에서 분양받아 사용하였다.

2) JKK238 균주의 동정

균주의 동정을 위해 Bergy's manual에 준한 생화학적 분석 외에도 세포벽의 지방산 분석, 16S rDNA 염기서열 분석을 시행하였다. 지방산 분석을 위한 시료조제는 순수히 분리된 집락을 TSA(trptic soy agar)에 streaking하여 37℃에서 24시간 배양하고 그 집락을 굵어 Midi sherlock 시스템의 manual에 준해 일련의 유도화 과정을 행하여 Gas chromatography (Hewlette Packard 5890)로 세포벽에 함유된 지방산의 함량 분석 자료는 Midi sherlock 시스템의 표준균주의 자료와 비교 분석되어 그 균주의 속과 종의 동정을 추정하였다. 세균의 분자생물학적 동정법으로 널리 이용되는 16S rDNA 염기서열 분석은 16S rDNA의 conserve

sequences를 참조하여 합성한 fD1과 rP2 primer을 사용하여 JKK238의 염색체 DNA로부터 PCR 방법으로 단편을 합성 분리하여 T-vector에 클로닝한 뒤 염기서열을 분석하였다. 결정된 염기서열은 DNASTAR의 MEGALIGN program을 사용하여 비교 분석되었다.

3) 항균성 검정

식물 병원균에 대한 항균력 측정은 PDA 고체배지에 3-5일간 배양된 자란 곰팡이들을 수술용 칼로 먼저 0.3 mm × 0.3 mm 크기로 잘라 PDA 고체배지의 중앙에 접종한 다음, 그 주위에 지름 6 mm의 살균 paper disc를 올려놓고 0.45 um filter로 제공된 암모늄 설페이트 침전액을 20 μl씩 일정하게 주입하였다. 28°C의 항온기에서 3일간 배양한 후 병원균이 자라지 못하는 저지대의 반경을 측정하여 항균력을 측정하였다.

4) 약리성 검정

항염증, 신생세포 혈관억제성, 세포독성에 관한 검정은 제1세부과제에 의해 서술된 방법으로 수행하였다.

나. 생리활성물질의 분리, 정제 및 이화학적 특성

1) 조시료의 조제

JKK238 균주의 종배양액을 500 ml의 TSB(Tryptic Soy Broth, Difco BRL사)에 1%(v/v) 접종하고 38°C에서 3일간 진탕 배양한 뒤, 원심분리하여(6,000×g, 20분) 상층을 회수하였다. 회수된 상층 배양액은 ammonium sulphate 분말 100 g을 서서히 가하면서 최종 25% 농도가 되게끔 완전 용해시키고 재 원심분리하였다. 침전된 펠렛은 멸균증류수 20ml로 녹이고 셀룰로오즈 투석막에 넣어 이틀간 투석하였다. 투석된 시료는 -20°C에서 보관하면서 다음 단계의 정제 시험에 사용하였다.

2) C¹⁸ column chromatography

C¹⁸ column chromatography에 의한 활성 분획의 분리는 다음과 같은 용출 용매로 행하여 각 분획의 항균성 검정을 수행하였다. 역상 C¹⁸ column에(Water사 Preparative C¹⁸ 55-105 μm, 내경 2 cm × 길이 30 cm) 상기의 조시료 40 ml을 loading하고 증류수 → 10% acetonitrile → 30% acetonitrile → 50% acetonitrile → 70% acetonitrile → 100% acetonitrile 순으로 용출하여 항균성 검정을 행하고 주 활성분액을 감압농축한 후 더 정제를 위한 FPLC의 시료로 사용하였다.

3) FPLC에 의한 정제

이것의 정제는 Amersham-Pharmacia의 FPLC시스템(AKTA)을 사용하였다. 여기서 여러 펌프타이드의 최적분리를 위해 역상칼럼인 5RPC ST 4.6/150을 고정상으로하고 0→50%→

50%→70%→100% 경사의 water-acetonitrile(in 0.1%TFA)을 이동상으로 214 nm의 파장에서 각 펩타이드의 피크 profile을 추적하고 각 분액을 다시 생리활성 검정한 뒤 각 피크의 해당 분액을 모아서 투석 후, 동결건조하여 구조 동정을 위한 기기분석 시료로 사용하였다.

4) Thin Layer Chromatography에 의한 Bio-autography

물질의 분석을 위해서 행하는 TLC는 silica gel 60 plates(Merck사)를 사용하고 전개 용매의 조성은 chloroform-methanol-water(65 : 25 : 4, v/v)이었다. lipopeptide의 확인은 물로 분무하여 탐지하였다. TLC의 bioautography를 위해 위와 같이 분리된 TLC plate는 사각형 페트리디시(가로 14 cm × 세로 14 cm)에 놓고 자외선으로 30분간 멸균한 뒤 멸균된 PDA와 느타리버섯 푸른곰팡이 병원균인 *Trichoderma* sp. 포자를 혼합하여 50℃로 식히고 분주하여 30℃에서 하룻밤 배양하여 항진균 저해 zone을 확인하였다.

5) 아미노산조성 분석

6) NMR 분석

7) MALDI-TOF MS 분석

다. 항진균 유전자군의 분리 및 구조분석

1) *Bacillus* sp. JKK238균주의 유전자 은행제작

1차년도에서 선발된 항균 및 항염증 펩타이드를 생산하는 균주인 JKK238의 유전자 은행을 제작하기 위해 두 종류의 vector (Supercos, EpiFos)를 사용하여 실험하였다.

가) *Bacillus* sp. JKK238의 genomic DNA 분리

양질의 유전자은행을 제작하기 위해서는 공시균주로부터 가능한 한 150Kb이상의 genomic DNA를 분리하는 것이 매우 중요하다. 공시균주를 5 ml의 LB broth에 접종하고 하룻밤 37℃에 배양하였다. 다음날 균체를 원심분리하여(×5,000 rpm, 10분) 수확한 뒤 lysozyme 5 mg/ml이 첨가된 2 ml의 GTE buffer (50 mM glucose, 10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8)에 골고루 현탁시켜 37℃에서 30분간 반응시켰다. 여기에 Pronase (20 mg/ml)와 RNase (10 mg/ml)을 넣고 37℃에서 50분간 반응 후 10% SDS를 1/10배로 넣고 50℃에서 30분간 재반응 시켰다. 이렇게 lysis된 액은 동량의 Phenol로 2회, Chloroform:Isoamylalcohol (24:1)로 2회씩 추출하여 원심분리하고(×12,000 rpm, 10분) 그 상층액을 모아서 5 M NaCl 1/10배, 2배의 냉각 에탄올을 첨가하여 조심스럽게 흔들어주어 실타래처럼 엉키는 DNA를 hooking하고 95% 냉각 에탄올로 씻고 실온에서 풍건한 뒤 200 μl의 TE buffer에 녹여 -20℃에 보관하여 사용하였다.

나) EpiFos library 제작

Fosmid백터는 대장균내에서 single copy로 유지하기 때문에 큰 크기의 유전자 단편의 (35~45Kb) cloning 과 안정성을 대폭 개선한 백터이다. 본 library의 제작은 EpiFos Fosmid Library Production Kit를 사용하여 다음과 같은 방법(Epicentre사의 protocol)에 준해 행하였다. 공시균주의 정제된 genomic DNA를 주사기로 serial shearing을 한 다음 40 kb로 shear된 genomic 단편분액의 훼손된 양 말단을 blunt로 만드는 반응을 행한 후, low melting agarose 전기영동에서 해당 크기의 blunt-end DNA를 GELase로 정제하였다. 정제된 해당 크기의 유전자단편들은 pEpiFos-5 vector와 실온에서 2시간 ligation 반응시키고 그 반응액 10 μ l을 MaxPlax Lambda Packaging Extract에 일련의 packaging 반응을 행하였다. 그리고 package된 phage particle의 serial 희석 양을 대장균의 EP1100에 transfection시킨 후 Chloramphenicol (12.5 μ g/ml)/LB에 도말하여 37°C에 배양한 후 자란 집락을 계수하여 packaged fosmid clone을 titering하여 유전자 은행을 제작하였다. 제작된 유전자 은행의 삽입 단편을 확인하기 위한 재조합 palsmid 분리는 Qiagen사의 mini-prep kit를 사용하였다.

2) Library Screening을 위한 iturin A ORF의 부분 클론 제작

본 실험은 제 2 세부과제에서 수행한 연구 결과로 얻어진 iturin A synthase의 부분 클론을 제공 받아 이용하였다.

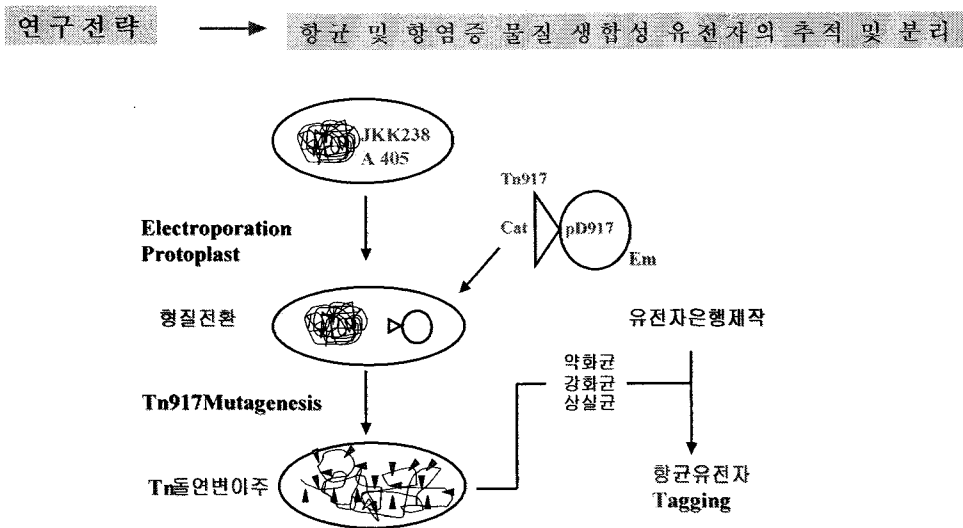
3) *Bacillus* sp. JKK238 균주의 전기충격 형질전환 Competent cell 조제

Bacillus sp. JKK238 균주의 Tn돌연변이 유기를 위해서는 이 균주에 Tn을 가진 plasmid로 형질전환시키는 것이 필수적이다. 일반적으로 *Bacillus* 속의 형질전환은 세계적으로 표준균주인 *B. subtilis* 168 strain에서는 비교적 높은 효율의 competent cell제작이 가능하지만 자연에서 분리된 *Bacillus* sp.의 형질전환 효율은 기존의 방법이나 조건이 적합하지 않은 예가 대부분이다. 따라서 본 실험은 *Bacillus*와 같은 그람양성 박테리아에 작동가능한 Tn917ac1운반 백터인 pD917 plasmid나 mini-Tn10을 carrying하는 pHV1248을 형질전환하기 위해 다음과 같이 electroporation용 competent cell을 제조하였다. 대조구 plasmid는 *Bacillus subtilis*에 작동하는 pUB110 (Km)과 pC194 (Cat)을 사용하였다. 하룻밤 배양한 JKK238균주를 성장배지(LB + 0.5 M sorbitol)에 16배 희석 접종하고 37°C에서 배양하여 OD_{600nm}치가 0.85~0.95되도록 자라게 한다. 배양액은 얼음물에서 10분간 냉각시키고 4°C에서 원심분리하여 세포를 수확하였다. 수확된 세포는 사전 냉각된 electroporation 배지(0.5 M sorbitol, 0.5 M mannitol 과 10% glycerol)으로 4차례 세척하고 최종적으로 electroporation media에 40배 농축($1 \times 10^{10}/\text{ml}$)하여 -80°C에 보관하였다. 형질전환 실험을 할 때는 보관된 electro-competent 세포 60 μ l에 plasmid DNA 50ng을 혼합하고 electroporation cuvette(1mm electrode gap)으로 이전하여 1분간 반응 후 25 uF와 200옴스트롬으로 고정된 Gene-Pulser에서 400V~2200V의 여러 조건으로 전기충격을 가하였다. 전기충격이 끝난 세포는 1 ml의 recovery media를 첨가하고 37°C에서 3시간 배양하여 도입되는 plasmid 종류에

따라 (pUB110; Kanamycin 20 μ g/ml, pC194, pD917 & pHV1248; Chloramphenicol 10 μ g/ml) 해당 항생제 선발배지에 도말하여 배양한 뒤 자란 집락을 계수하였다.

4) Transposon 돌연변이 유기

그람양성균에서는 작동가능한 transposon은 Tn917이 가장 유력하며 *Bacillus subtilis* 표준 균주에서는 그 성공 사례가 많이 보고된 바 있다. Tn917 시스템을 이용한 대표적인 벡터는 pTV series이나, 본 실험에서는 Tn 변이주로부터 Tn삽입부위의 인접 sequences의 self-ligated cloning이 가능한 Tn917ac1 (4.6kb; Amp, Cm)을 운반하는 pD917(11.5kb: Em)을 사용하여 transposon 돌연변이를 유기할 것이다. 돌연변이의 유기는 하룻밤 배양한 JKK238 (pD917나 pHV1248) 균체를 Erythromycin이 0.015 μ g/ml 함유된 LB액체 배지 5ml에 세포농도가 5×10^8 /ml이 되도록 접종하고 38 $^{\circ}$ C에서 3시간 배양하여 삽입을 유도하고 다시 48 $^{\circ}$ C로 온도전환하여 pD917이 curing되도록 3시간 배양하고 그 배양액을 Chloramphenicol (5 μ g/ml) 함유 배지에 500 μ l씩 분주, 도말하여 48 $^{\circ}$ C에서 자란 균주를 선발하였다. JKK238에 Tn mutagenesis를 유도하는 연구전략은 아래 그림과 같다.



5) 향균성 검정

지시병원성 곰팡이(*Colletotrichum gloeosporioides*, *Trichoderma* sp.)에 대한 향균력 측정은 PDA 고체배지에 접종된 곰팡이를 25 $^{\circ}$ C에서 2주간 배양하여 포자를 형성시킨 뒤 그 포자를 멸균수에 현탁하여 PDA배지 분주할 때, 적정량 첨가하고 흔들어서 검정용 배지를 만들어 4 $^{\circ}$ C에 보관하고 필요할 때 꺼내어 사용하였다. 식중독균인 *Listeria monocytogenes*는 *Listeria* enrichment배지에 접종, 하룻밤 배양 후, 균체를 수확하여 LB고체배지 분주할 때 적

정량 첨가하여 검정용 배지를 만들어 사용하였다. 유전자은행으로부터 얻은 균주는 이들 검정용 배지에 멸균된 이쑤시게로 picking하여 곰팡이는 25℃, *Listeria*는 38℃에 하룻밤 배양하여 균 집락 주변의 저해대를 관찰하여 선발하였다. 가능성이 있는 후보주는 TSB (Tryptic Soy Broth)액체배지에 3일간 배양하고 0.45 μm 제균 필터로 균을 제거한 후 각 검정배지에 멸균종이 disc를 얹고 그 상층을 200 μl 씩 loading 하고 적정온도에 배양하여 저해대 유무를 관찰하였다.

6) 항균 펩타이드 생합성 유전자의 선발 및 분리

유전자은행으로부터 항균펩타이드 생합성 유전자를 보유한 클론을 선발하기 위해서 JKK238이 생산하는 것으로 알려진 항진균 펩타이드인 Iturin 유전자를 probe로 하여 통상적인 방법으로 colony hybridization을 행하여 선발하였다.

2. 연구 결과

가. *Bacillus* sp. JKK238균주의 동정 및 특성

1) 생리활성 물질 생산 미생물의 선발 및 동정

전국에서 채취한 다양한 환경의 경작지 토양으로부터 분리한 형광성 *Pseudomonas* 및 *Aspergillus*를 포함한 1,300여 주와 전국각지에서 수집한 짓갈에서 분리한 세균 700여 주를 대상으로 한국에서 문제가 되는 6종의 식물병원성곰팡이(*Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Collectotrichum coccodes*, *Fusarium oxysporum*, *Pyricularia oryzae*, *Trichoderma* sp.)에 대한 길항검정을 하여 1차 선발한 결과 두 종 이상에서 우수한 길항력을 보여주는 광범위 항균력 균주 79주와 1종에 특이적 길항력을 보이는 균주 41주를 선발하였으나 항균 원인물질이 단백질이나 펩타이드일 가능성을 검색하는 2차 선발과정에서 단지 6주가 선발되었다(선발에 관련된 low data는 생략함). 우리는 이 6주 배양액의 암모늄 설페이트 침전물에서 항균효과가 탁월하고 다양한 지시병원균에 광범위한 항균성을 보이는 JKK238(짓갈에서 분리)을 본과제의 공시 균주로 최종 선택하였다. 선발된 JKK238 균주의 형태적 생화학적 특성은 Table 3-2에서 보는 바와 같으며 특히 이 균주는 간균 형태의 크기가 약 $0.74 \mu\text{m} \times 2.6 \mu\text{m}$ 인 그람 양성균의 간균으로서 편모를 가지고 포자 형성능이 있으며 TSB고체 배지 상의 성장 초기에 점질성 집락을 형성한다. 또한 38°C 가 최적 성장 온도이며 55°C 이상에서는 영양적 성장이 불가능하고 7% NaCl이 첨가된 고농도의 염 배지에서 성장이 가능하다. 또한 JKK238의 또 다른 동정을 위해 세포벽의 지방산 조성 분석과 16S rDNA 염기서열을 결정하였다. Table 3-1은 JKK238 균주의 세포벽 지방산 조성을 표준균주인 *Bacillus subtilis* ATCC37015와 비교한 결과인데 Midi sherlock 시스템의 data bank와 비교 분석시 *Bacillus subtilis* 표준균주에서 전형적으로 나타나는 5종의 지방산이 유효한 양으로 탐지되었으며 그 유사성이 0.711임을 보여주었다. 또한 JKK238의 16S rDNA를 포함한 클론의 염기서열 분석 결과에서 총 954의 염기배열중 945 개가 표준균주인 *Bacillus subtilis*와 약 99%의 rDNA 염기서열 상동성을 보였다(rDNA 염기서열 자료 생략). 이상의 결과에 따라 JKK238은 *Bacillus* 속임이 확실하고 종은 *Bacillus subtilis*에 속하는 균주임이 매우 유력한 것으로 추정된다.

Table 3-1. Biochemical and physiological characteristics of JKK238 strain

Characteristics	JKK238 strain
Gram stain	+
Morphology	mucoidy and sticky
Formation of spores	+
Mobility	+
Flagella	1
Optimal temperature	37
Catalase	+
Casein hydrolysis	+
Gelatin hydrolysis	+
Utilization of propionate	-
Utilization of citrate	+
Deamination of phenylalanine	-
7% NaCl	+
10% NaCl	-
Nitrate reduced to nitrite	+
Egg yolk	-
Decomposition of tyrosine	-
Formation of citrate	-
Formation of indole	-

Table 3-2. Fatty acids composition of JKK238 cell walls by MIDI sherlock systems

strains	Fatty acids composition(%)				
	15:0 iso	15:0 ante	16:0	17:0 iso	17:0 ante
JKK238	38.6	33.4	2.5	9.2	4.5
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC37015	32.8	37.4	3.0	8.5	7.8

2) *Bacillus subtilis* sp. JKK238균주의 생리활성(항균성, 약리성) 특성

3일간 배양된 JKK 238 배양액의 25%암모늄 설페이트 침전물의 항균 스펙트럼을 확인하기 위하여, 식물에서 심각한 병해를 일으키는 6종의 곰팡이, 1종의 세균 및 1종의 방선균, 2종의 식중독 세균 및 다수의 젖산균 등을 지시균으로 시험관 내(*in vitro*) 항균성 검정을 수행한 결과는 Table 3-3에서 보는바와 같다. 이 시료는 벼도열병균(*Pyricularia oryzae*), 포도 및 딸기 잭빛 곰팡이병균(*Botrytis cinera*), 과채류의 저장병균(*Penicillium* sp.), 토마토의 시들음병균(*Fusarium oxysporum*), 고추의 탄저병균(*Collectotrichum glospoiroideus*) 및 무의 잘록병균(*Rhizoctonia solani*)로 이루어진 6종의 공시 병원성 곰팡이 모두에 대하여 뛰어난 항진균 활성을 보였다. 특히, 벼도열병균(*Pyricularia oryzae*), 포도 및 딸기 잭빛 곰팡이병균(*Botrytis cinera*)에 대하여 가장 강력한 항균활성을 보였다. 또한, 본 조 시료는 특이하게도 곰팡이와 세포벽의 구조가 매우 다른 세균이나 방선균의 일부 중에서도 항균활성을 나타냄을 확인하였다. 즉, 감자의 더덩이병을 야기하는 방선균(*Streptomyces scabies*), 원예작물에 연부병을 일으키는 병균(*Erwinia caractovora*) 및 변질된 햄이나 소세지에서 식중독을 일으키는 병균(*Listeria monocytogenes*)에 대하여 뛰어난 항균 활성을 보였다. 특히 JKK238배양액의 조시료는 Figure 3-1에서 보는 바와 같이 proteinase K 처리나 열처리(100°C, 30분)에서도 항균활성의 손실이 거의 없는 것으로 나타났다. 이외에도 조시료 12 µM 내외의 낮은 농도에서도 염증작용을 유발하는 것으로 알려진 nitrite 발생량을 현저히 감소시켰다. 그러나 JKK238 조시료는 신생 혈관 형성 억제시험에서는 거의 효과가 없는 것으로 나타났다. 따라서 JKK238 조펩타이드는 우수한 항염증제 및 항곰팡이제로의 개발 가치를 부여해 준다.

Table 3-3. Antimicrobial spectra of *Bacillus subtilis* sp. JKK238 against plant pathogenic fungi and bacteria.

Fungi		Bacteria	
<i>Botrytis cinera</i>	+++	<i>Erwinia carotovora</i>	++
<i>Pyricularia oryzae</i>	+++	<i>Listeria monocytogenes</i>	+++
<i>Fusarium oxysporum</i>	+++	<i>Streptomyces scabies</i>	+++
<i>Rhizoctonia solani</i>	++	<i>Streptococcus aureus</i>	+
<i>Phenicillium</i> sp.	+++	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Collectotrichum glospoirideus</i>	+++	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-

+++ : 10~15 mm, ++ : 5~10 mm, + : 5 mm 이하

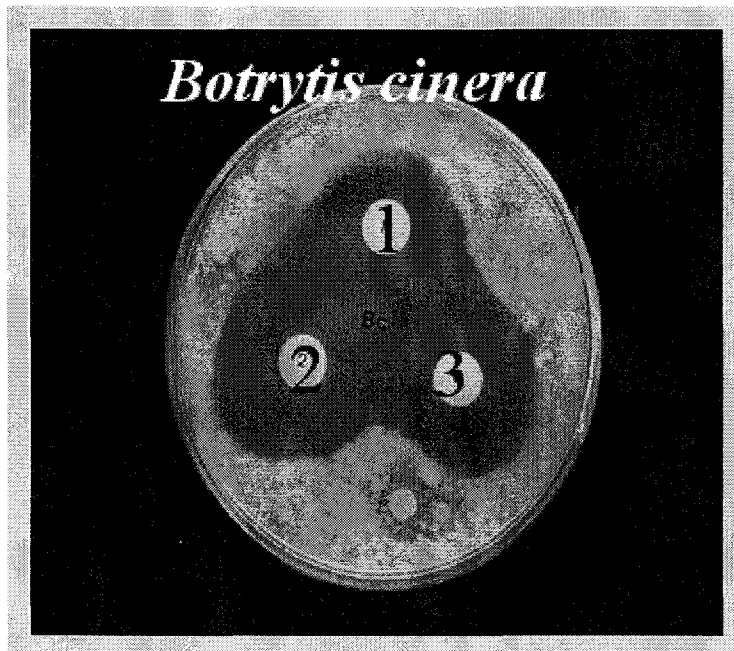


Figure 3-1. Antifungal activities of 25% ammonium sulphate precipitates of JKK238 cultures.

- 1; 25% ammonium sulphate precipitates of JKK238 cultures
- 2: Proteinase K treatment(1.4 mg/ml, 30°C, 24 hrs)
- 3: Heat treatment (100°C, 30 min)

나. 생리활성물질의 분리, 정제 및 이화학적 특성

1) 생리활성 유효물질의 분리 및 특성

항균력의 존재가 확인된 조시료는 상기 방법에서 설명한 C18 칼럼에 의해 활성분액을 분리하였다. 분리된 분액은 Table 3-4에서 보는 바와 같이 7종의 병원균에 대한 활성을 조사하였다. 여기서 식물병원성 곰팡이의 주 활성 분획은 50% Acetonitrile 2번 분획에서 용출되었고, 식중독균인 *Listeria monocytogenes*에 대한 주활성 분획은 50% Acetonitrile 3번 분획이었다. 이들 50-2와 50-3을 모아서 농축한 시료는 상기에서 설명한 FPLC 조건에서 분리하였다(Figure 3-2).

Table 3-4. Anti-microbial spectra of each fraction separated by C¹⁸ chromatography

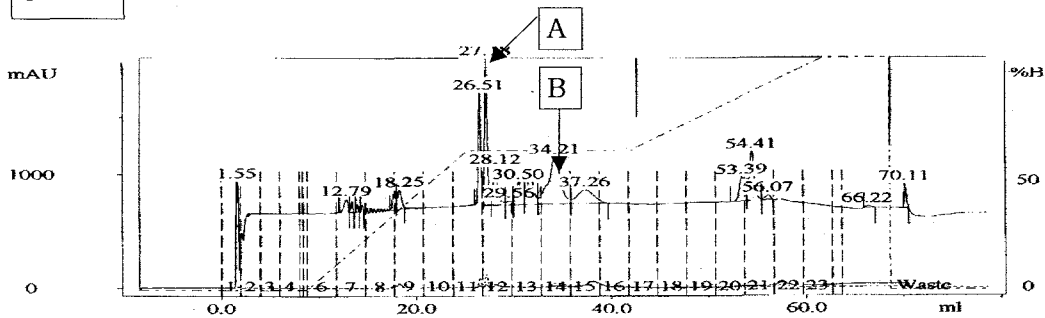
Indicator Pathogen	Acetonitrile concentration for elution (%)											
	10%			30%			50%			70%		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
S.s	-	-	-	-	-	-	+++	++	-	-	++	++
R.s	-	-	-	-	-	-	+	+++	++	-	-	-
F.o	-	-	-	-	-	-	-	++	+	±	+	-
C.c	-	-	-	-	-	-	-	+++	++	++	+	-
B.c	-	-	-	-	-	-	-	+++	++	+	+	-
T	-	-	-	-	-	-	+	+++	++	++	+	-
L.m	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	++	+	-

L.m; *Listeria monocytogenes* S.s; *Streptomyces scabies* R.s; *Rhizoctonia solani*
 F.o; *Fusarium oxysporum* C.c; *Colletotrichum cocci* B.c; *Botrytis cinera* T; *Trichoderma* sp

각 피크를 모아 활성 검정을 한 결과는 50-2의 주 피크 중 A피크가 강한 항진균 활성, B 피크는 보다 약한 항진균과 항염증 효과, 50-3의 C피크는 *L. monocytogenes*에 대한 항균활성의 주 유효물질임이 추정되었다. 우리는 이외에도 유효 활성물질의 부분 정제를 위해 hydrophobic chromatography의 일종인 phenyl sepharose 4B(φ1.5×20cm)에 이동상 용매 (6 mM phosphate buffer, pH6.8 → 70% ethylene glycol in 6 mM PB)를 linear gradient로 하여 유효 물질을 분획하였다(1 ml/분, 25 ml/tube). 총 17분획에 대한 항균성 검정에서 10번에서 14번 분획이 주 유효물질로 나타나 이들이 매우 소수성이 강한 물질임을 알 수 있었으며 이들 분획을 투석막으로(M.W; 14,000) 투석시 감자더듬이병균을(*Streptomyces scabies*)

제외한 공시 지시병원균에 항균활성의 변화가 없다는 점이나 FPLC상의 gel filtration column을 통한 분획에서 주 항균물질의 분자량이 60,000으로 추정된다는결과(미공개 자료)로 유추하여 처음에는 이들이 단백질일 가능성이 유력한 것으로 생각하였으나 Tris-tricin SDS-PAGE의 Bioautography 결과(미공개자료) 및 maldi-tof 결과는 이것이 분자량이 매우 적은 peptide임을 확실히 보였다. 또한 TLC상의 분리와 물에 의한 유효밴드의 탐지나 Figure 3-3의 proton NMR 결과에서 지방산쇄 존재의 분명한 시그날은 이들 물질이 항균성 *Bacillus* 에서 흔히 생산되는 일종의 lipocyclopeptide임을 분명히 보여주고 있다. 결과적으로 투석막에서 주 유효물질이 빠져나가지 못하는 이유가 이들이 극성과 비극성으로 이루어진 lipocyclopeptide로 수용액상에서 고농도로 존재시 단량체가 모여져 분자량이 큰 미셀(micell)로 존재하기 때문인 것으로 설명할 수 있다. 이것을 뒷받침해주는 최근의 보고가 있다(A. Grau 등, 2001).

50-2



50-3

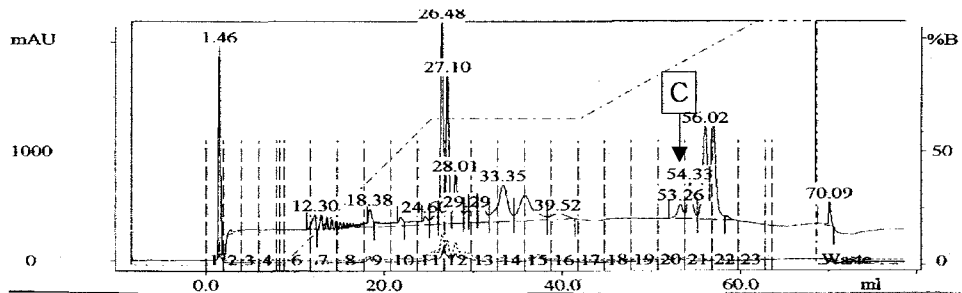


Figure 3-2. FPLC Chromatogram of major antimicrobial fractions separated by C18 column chromatography.

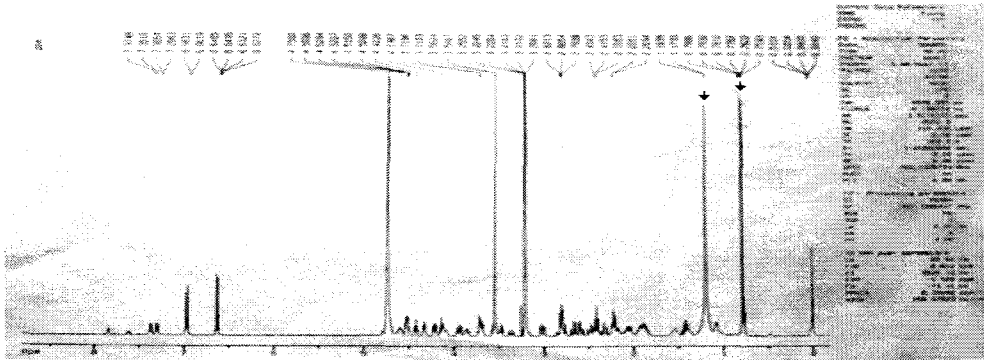
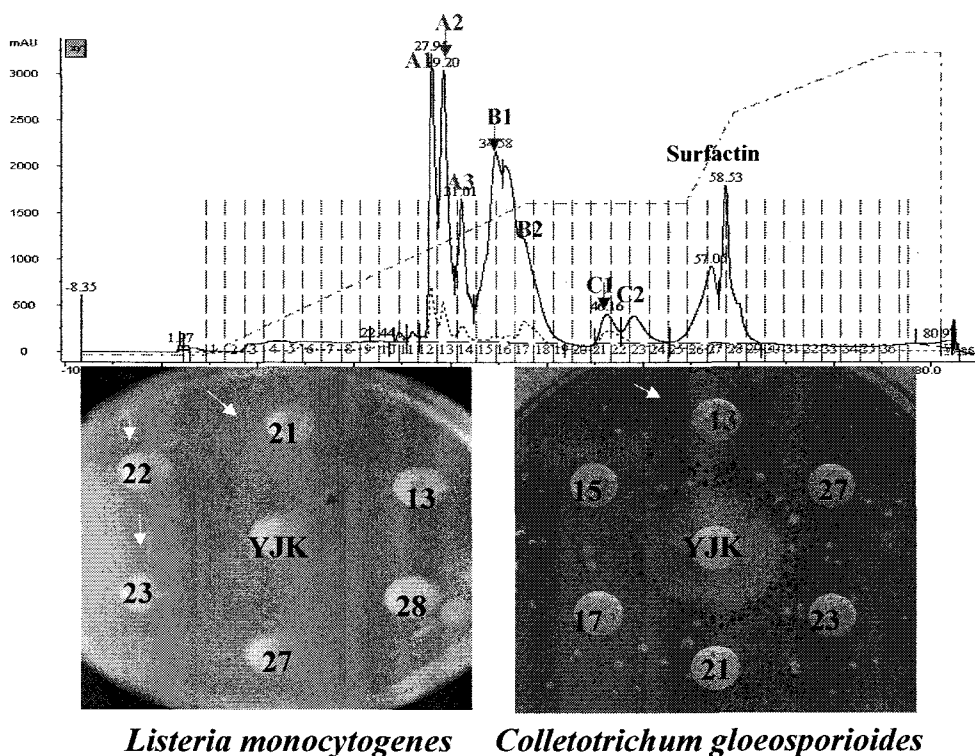


Figure 3-3. H-NMR spectra of A2 fraction purified by FPLC.

2) 생리활성펩타이드의 정제

공시균주인 *Bacillus* sp. JKK238의 배양액으로부터 생리활성 펩타이드의 분리는 상기 방법과 조건에 준해 조시료(AMP)를 조제하고 FPLC시스템으로 각기 분리하였다. 조시료의 FPLC chromatogram은 약 10여 개 이상의 피크가 관찰되었으나, 제일 앞부분의 피크들은 투석(MW: 1,000)시 빠져나가는 저분자물질로 항균성과 항염증의 주 유효물질이 아님을 확인하였기 때문에 Figure 3-4과 같이 크게 3그룹으로 구분될 수 있었다. 여기서 정제된 각 분획에 대한 생리활성 검정 결과(Table 3-5)에서 보는 바와 같이 A2 (13번 fraction)는 항진균에 주 유효물질임을 알 수 있었고 B1(15번), B2(17번)는 약간의 항진균 효과와 주 유효 항염증 물질임을 확인하였다. C1피크(21번)와 C2피크(23번)는 매우 minor한 피크이나 항곰팡이와 항염증에 유효하지는 않지만 항listeria의 주 유효 peptide이었으며 나머지 뒷 부분의 두 피크는 매우 강력한 생세정 활성을 보였다(Table 3-5). 각각의 유효피크는 수 십 차례 FPLC로 동일 조건에서 분리하여 해당 분획을 모아서 충분한 투석 후 냉동건조하여 분말로 만들고 이것을 항염증 검정과 NMR, Maldi-tof 등 구조분석의 시료로 사용하였다(Figure 3-5). 한편 본격적인 구조분석에 들어가기 전, TLC상에서의 항진균 유효물질을 확인하기 위한 bioautography 실험에서 상기 기술된 용매로 전개된 TLC 판을 lipo-peptide의 탐지가 가능한 물로 분무하여 관찰하면 A2피크는 Rf치 0.62 부근에 물에 젖지 않는 단일밴드가 나타나는데 이 밴드는 기 보고된 항진균 펩타이드인 Iturin 표품과 동일한 Rf치를 가지므로 Iturin으로 추정된다. 또한 전개된 TLC판은 느타리버섯에서 발생하는 푸른 곰팡이병의 원인균인 *Trichoderma* sp. 포자를 대상으로 Bioautography를 행하였으며 여기서 A2 피크가 강력한 항진균 효과의 주 원인 물질임을 확인할 수 있었다(Figure 3-6).



Listeria monocytogenes *Colletotrichum gloeosporioides*

Figure 3-4. Anti-microbial assay of each fraction separated by FPLC.

Table 3-5. Bioactive assay of each fractions separated by FPLC.

Peak	Antibiosis			1 μ g		
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Listeria monocytogenes</i>	Anti-inflamma tory activities	Cytotoxicity	
A	A1	++	++	—	N.T	N.T
	A2	+++	+++	±	++	+++
	A3	++	++	—	N.T	N.T
B	B1	++	++	—	+++	—
	B2	++	++	—	N.T	N.T
C	C1	—	—	+++	+++	+++
	C2	—	—	++	+++	+++

Antibiosis: +++ (>10mm), ++ (10~5mm), ± (< 5mm)

Anti-inflammatory activities: +++ (> 90%inhibition of NO production), ++ (70%)

Cytotoxicity(MTT assay): +++ (> 90%death ratio), — (< 1%)

N.T: not tested

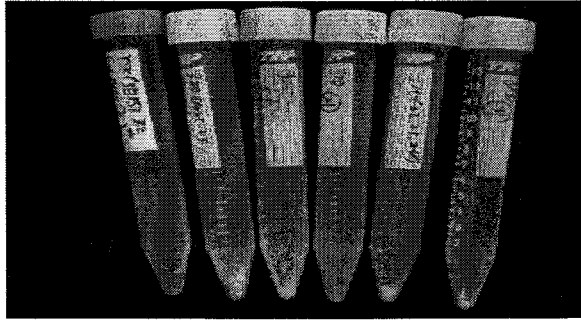


Figure 3-5. lyophilized powder of each peak purified by FPLC.

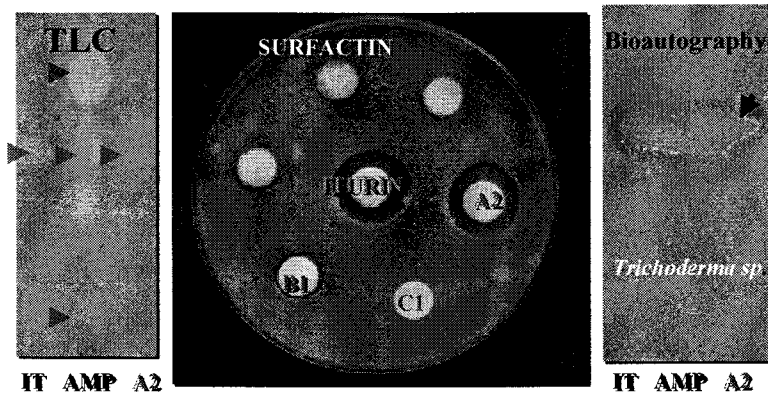


Figure 3-6. Anti-fungal activity assay of each fractions separated by FPLC and TLC
 * IT; iturin, AMP; crude 25% ammonium sulphate precipitates of JKK238 cultures

3) 생리활성 펩타이드의 구조 분석

Lipopeptide 구조 결정은 각각 Correlation Spectroscopy(COSY), Total correlation spectroscopy(TOCSY), Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy(NOESY) 실험의 결과와 Maldi-tof에 의한 결과를 종합하여 판단하였다.

가) 항진균 유효물질(A1, A2, A3 lipopeptide)의 구조 분석

FPLC에서 정제된 A 피크들을 동결건조하여 maldi-tof 분석을 행하였는데 A1과 A2 피크는 모두 분자량이 1,057로 나타났고 이 결과는 *Bacillus*에서 기 보고된 항 곰팡이 펩타이드인 Iturin A3, A4, A5와 분자량이 동일하였다(Figure 3-7). 그러나 A3는 1,071가량으로 iturin A6, A7과 유사하나 보다 자세한 검토가 필요하다(미공개 자료). 이들 lipopeptide분액의 항진균 검정(*Colletotrichum glosporioides*)에서 A2외에는 그 활성이 거의 없거나 매우

미약하였다. A2(#13 lipopeptide)와 표품 iturin A의 TOCSY-NMR spectra는 거의 일치하였으므로 이것의 peptide moiety는 iturin A와 동일하나 그것의 구성분인 지방산 chain부분의 결합양식이 다소 다를 수 있다고 추정된다.

2D COSY 분석결과 A3(14번 peak)는 Glu, Ser, Pro, Tyr, Asp (4)의 8개의 amino acid가 포함되어 있는 것을 알 수 있다. 이는 COSY 실험에서 NH peak과 α -proton peak의 연결을 보고 판단하였다. 이는 다시 2D TOCSY 실험으로 더 자세히 확인할 수 있는데, 이는 NH peak과 α -proton peak의 연결이 COSY와 일치한다. Tyr 과 Asp 는 둘 모두 α 와 β -proton을 가지고 있어서 2D TOCSY에서 그 유형이 비슷한데 이는 Tyr의 aromatic ring에 의한 2D NOESY peak을 확인함으로써 구분할 수 있다. Glu은 α , β 와 γ -proton을 지니고 있어서 3개의 peak이 나타난다. Ser의 β -proton은 -OH기로 인해 3.66ppm 부근에 나타나는 특징이 있다. Pro은 8ppm 부근의 NH peak이 없으므로 NH peak과 α -proton peak의 연결로 확인할 수 없다. 따라서 α (4.16ppm), β (2.14 2.00ppm), γ (1.88 1.78ppm), δ (3.76ppm)의 특이적인 연결을 찾을 수 있다. 14번 peak는 예상구조인 Iturin (Asp-Tyr-Asn-Gln-Pro-Asn-Ser)보다 Asp가 1개 더 존재한다. 이것은 Pro을 제외하고는 모든 amino acid에 α -proton이 존재하므로 2D TOCSY에서 8ppm 부근의 NH peak과 각 amino acid의 α -proton peak 연결을 확인한 결과 총 7개의 amino acid가 포함되어 있는 것을 알 수 있다. 여기에 NH peak이 없는 Pro을 포함시키면 총 8개의 amino acid가 존재함을 알 수 있다. 또한 proton NMR실험에서 integration으로 각 peak의 개수를 확인한 결과 8개와 일치하였다(Table 3-6).

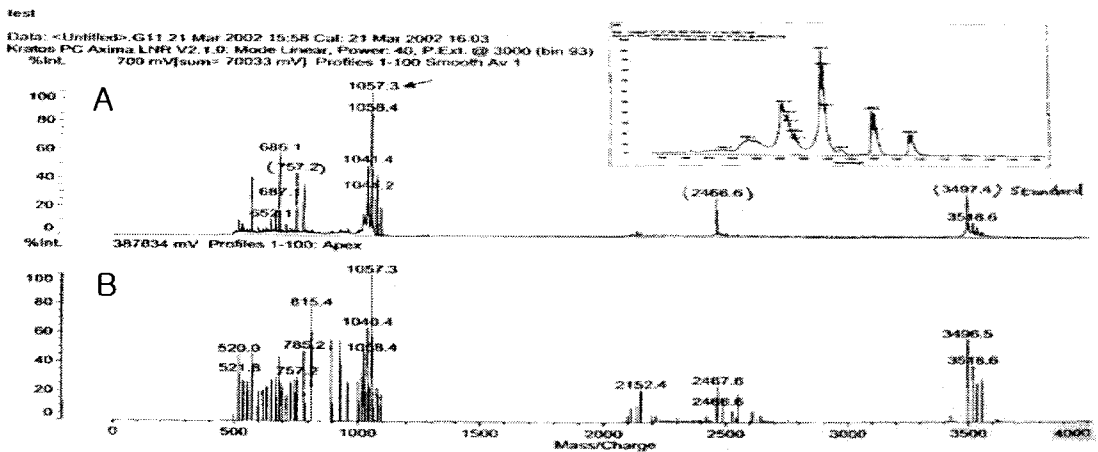


Figure 3-7. Maldi-ToF chromatogram of iturin standard and A2peak purified by FPLC

Table 3-6. ¹H chemical shift of A3(#14 lipopeptide) in DMSO by NMR analysis

Chemical shift				
Amino acid	NH	CαH	CβH	CγH and Othres
Glu	7.141	3.974	1.413 1.221	2.348
Ser	7.337	4.176	3.669	
Pro	-	4.167	2.143 2.002	1.887 1.781 δ 3.766
Asp	7.725	4.424	2.297 2.174	
Asp	6.989	4.521	2.063 1.751	
Asp	8.066	4.454	2.596 2.495	
Asp	8.698	4.03	2.971 2.755	
Tyr	8.698	4.44	2.723 2.477	δ 7.032 ε 6.664

나) 항염증 유효물질(B1, B2 lipopeptide)의 구조 분석

항염증 주 유효물질인 B1의 분자량은 약 1,464로 data base 검색을 한 결과 이는 기존 항진균성으로 알려진 lipopeptide인 Plipastatin A1(MW: 1463.7)이나 Fengycin의 분자량과 일치하였다(Figure 3-8). 이미 알려진 plipastatin은 10개의 아미노산(L-glutamic acid, D-ornithin, L-tyrosine, allo-Threonine, L-glutamic acid, D-alanine, L-proline, D-tyrosine, L-isoleucine)과 (CH₂)₁₂CH₃의 지방사슬로 구성되어있는 것으로 보고되어있으나 B1피크의 TOCSY NMR 분석에서 plipastatin이나 fengycin계열의 lipocyclopeptide가 반드시 가지는 특성인 proline의 시그널이 없을 뿐 만 아니라 구성 아미노산의 조성 차이가 현저하므로 보다 세밀하고 심층적인 구조 분석이 진행되어야 할 것으로 생각된다.

B2(#16번) peak의 2D TOCSY 분석 결과, Ala(3), Val, Tyr(2), Glu, Asp의 8개 아미노산이 포함되어 있다고 추정된다(Table 4). 이는 TOCSY 실험에서 NH peak과 α-proton peak의 연결을 보고 판단하였다. Tyr와 Asp는 Tyr의 aromatic ring에 의한 NOESY peak를 확인함으로써 구분할 수 있었다. Ala는 α (4.30ppm), β(1.36ppm)만을 지녔기에 두개의 peak로 나타난다. Val은 α (4.13ppm), β(2.00ppm), γ(0.97ppm)부근에 나타나며 γ-peak는 두 개로 갈라져서 나오는 특징이 있다. 15번은 16번과 TOCSY가 일치하며 이는 동일 구조임을 알 수 있다. B1(#15)peak는 상기에서 지적한 예상 후보 펩타이드인 Plipastatin(L-glutamic acid, D-ornithin, L-tyrosine, allo-Threonine, L-glutamic acid, D-alanine, L-proline, D-tyrosine, L-isoleucine)과 비교할 때 구성 아미노산 종류와 수에서 현저한 차이를 보이고 있다. 특히 Proline의 존재는 Plipastatin이나 Fengycin을 구분하는 중요한 아미노산인데 2D-NMR에서 이것의 특징적인 시그널을 전혀 발견할 수 없었다. 주지하는 바처럼 2D-NMR에서 Pro는 다른 아미노산과 달리 NH기가 없기 때문에 α (4.4ppm), β(2.24 2.00ppm), γ(2.08 1.91ppm), δ (3.70, 3.55ppm)의 특이적인 연결을 찾을 수 있으나, B1에서는 이러한 연결을 찾을 수 없었

다.

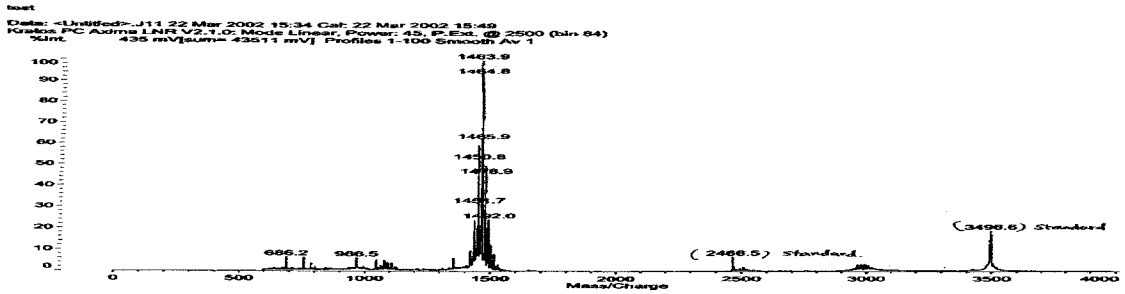


Figure 3-8. MALDI-TOF mass spectra of B1 peak purified by FPLC.

Table 3-7. ¹H chemical shift of B2(#16 lipopeptide) in DMSO by NMR analysis

Chemical shift				
Amino acid	NH	αH	βH	γH and Othres
Val	8.62	4.05	0.86	
Ala	8.26	4.44	0.85	
Ala	7.93	4.19	1.00	
Ala	7.60	4.15	0.98	
Tyr	8.23	4.28	1.74 1.54	δ 7.13 ε 6.92
Glu	8.02	4.28	1.77	γ 2.25
Tyr	7.90	4.20	2.16 1.68	δ 7.26 ε 6.76
Asp	7.62	4.37	1.90 1.65	

다) 항listeria lipopeptide(#21, #23, #26 lipopeptide)의 구조분석

#21과 #23은 TOCSY NMR spectrum에서 지방산쇄 관련 signal을 제외하고는 거의 일치하였다. 이들의 chemical shift들은 Table 5.에서 보는 바와 같다. 각 아미노산들의 spin system을 확인하기위해 COSY와 TOCSY실험을 수행하였다. COSY의 경우 두 개에서 세 개 bond사이의 proton을 관찰하는 것으로 NH와 αH와 βH, βH와 γH등의 연결관계를 확인할 수 있었다. 반면에, TOCSY의 경우는 coupling 되어있는 proton이 연속적으로 있는 경우 멀리 떨어져있는 proton들까지도 관찰이 가능하게 된다. 따라서 COSY와 TOCSY spectrum을 비교하게 되면 cross-peak의 patterns을 통해 각각의 아미노산을 구분할 수 있다. 또한 유사한 cross-peak patterns을 가지는 아미노산들의 경우는 이미 알려져 있는 평균 chemical shift값과 비교하여 구분할 수 있다. TOCSY에서 NH와 αH 사이의 cross-peak를 확인한 결과 모두

7개가 관찰되었다. 하지만 leucine 두개가 겹쳐있고 valine과 aspartic acid가 거의 겹쳐있어 쉽게 구분을 하기가 어려웠다. 그런데 leucine 두개의 경우 전체 spectrum의 intensity를 낮추었을 때 다른 peak들보다 월등히 강한 intensity를 보였기 때문에 이 부분에(NH: 8.37ppm) 두개의 leucine이 존재함을 알 수 있었다. valine과 aspartic acid는 α H와 β H의 연결관계를 통해 구분이 가능하였다. 또한 7개의 아미노산들과 연결되지 않고 남아있는 proton들은 지방산에 해당하는 peak들로 자기들끼리 연결되어있음을 확인할 수 있었다. 23번 lipopeptide의 TOCSY NMR spectrum은 Figure 3-11에서 보는 바와 같다. 21번과 23번의 proton NMR spectrum을 비교하였을 때 peptide부분에 해당하는 spectrum은 거의 일치하였다. 한편 이들에 대한 MALDI-TOF 결과는 22번의 경우 $MH^+ = m/z$ 1,018이고 23번의 경우 1,035임을 보여준다(Figure 3-9). 21번의 경우 23번과의 proton spectrum을 비교한 결과 lipid 부분을 제외한 peptide 부분이 거의 일치하는 것을 확인 하였다. Spin system을 확인하기 위해 TOCSY 실험을 수행 하였는데, 시료의 농도가 너무 낮아 모든 cross-peak들을 관찰 할 수는 없었다. 하지만, intensity 차이를 고려하면 거의 일치하는 것을 확인 할 수 있었다. 또한, 23과 fatty acid 부분이 약간 차이가 났는데, 2.73 ppm에 해당하는 탄화수소가 없는 것이 확인 되었다. 따라서 상기 결과를 종합할 때, 21번은 기저 알려진 surfactin의 지방산 부분이 C₁₁H₁₉(두개의 double bond 존재)이고 23번은 지방산 부분이 C₁₂H₂₅(포화탄화수소)인 것으로 추정된다. 보고에 의하면 일부 지방산이 *Listeria monocytogenes*의 성장을 저해함을 보고하고 있으므로(LL Wang 등, 1992) Sigma사에서 공급되는 표준 surfactin(MW: 1036)이 in vitro 항균검정에서 *Listeria monocytogenes*을 전혀 저해하지 못하는 결과와 연관지어 생각할 때, lipopeptide의 지방산종류나 결합 형태가 항균성의 효과와 기주를 결정하는데 관여하는 것으로 생각된다.

Table 3-8. ¹H chemical shifts of # 21(23) lipopeptide in DMSO

Amino acid	Chemical shift			
	NH	C _{α} H	C _{β} H	C _{γ} H and Others
Glu	9.83	4.27	2.01	1.83
Leu	8.37	4.34	1.66	1.48; C _{δ} H 0.90,0.83
Leu	8.37	4.34	1.66	1.48; C _{δ} H 0.90,0.83
Val	8.33	4.06	2.16	0.90,0.84
Asp	8.31	4.32	2.61,2.19	—
Leu	7.52	4.35	1.46	1.36; C _{δ} H 0.87,0.80
Leu	7.23	4.24	1.54	1.47; C _{δ} H 0.86,0.82
Fatty acid	1.22; 1.56; 2.33; 2.73; 4.97			

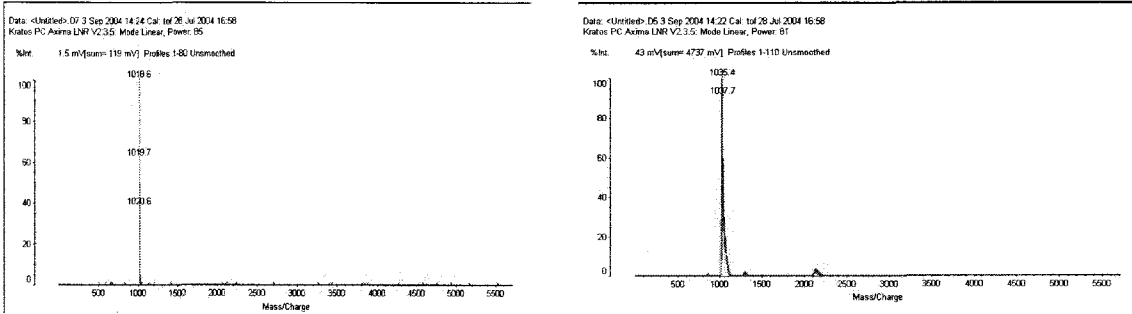


Figure 3-9. MALDI-TOF mass spectra of #21 (left) and #23 lipopeptide (right).

2D TOCSY 분석결과 26번 peak는 Leu, Val, Asp, Glu, Ala(2), Pro의 7개의 amino acid가 포함되어 있는 것을 알 수 있다(Table 3-9). 이는 2D TOCSY 실험에서 NH peak과 α -proton peak의 연결을 보고 판단하였다. Leu의 β 와 γ -proton은 2D TOCSY에서 근접하여 뭉쳐나올 가능성이 높으며 γ -proton은 0.9ppm부근에 나타난다. 또한 23번과 TOCSY NMR가 동일하다. 26번은 예상구조인 surfactin(Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu)과 Leu의 수에서 차이를 보이므로 차이가 있는 Pro와 Ala를 재차 분석한 바 Pro는 NH peak와 연결되는 것이 없으므로 Leu가 아니라고 판단되어지며 Ala는 Leu의 γ 와 δ 가 없으므로 Leu가아님이 분명하며 1개 이상의 Leu는 없는 것으로 판단되어진다. 그러나 아미노산 분석 결과는(Leu3, Asp, Glu) Leu와 Val의 수에서 하나씩 차이를 보이고 있다. 그리고 정제된 각 peak의 구성 아미노산 조성 분석, NMR 결과와 기 보고된 surfactin의 아미노산 구성을 상호 비교한 결과는 Table 3-10에서 보는 바와 같다.

Table 3-9. ^1H chemical shifts of # 26 lipopeptide in DMSO

residue	Chemical shifts (in DMSO)			
	NH	C α H	C β H	C γ H and Others
Leu	8.37	4.13	1.66	1.52; C δ H 0.83
Val	8.07	4.03	2.04	0.88,0.80
Asp	8.15	4.49	2.61	—
Glu	7.82	4.19	1.95,1.82	2.21
Ala	7.55	4.30	1.48	—
Ala	8.00	4.19	1.49	—
Pro	—	5.03	1.54	1.27,2.21; C δ H 2.42

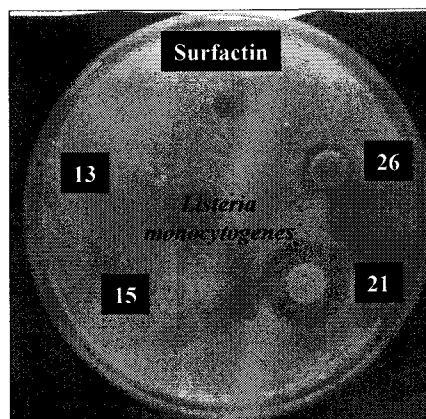
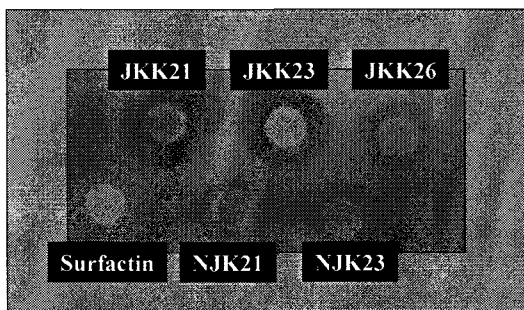


Figure 3-10. Inhibitory assays of lipopeptides from *Bacillus subtilis* JKK238 and NJK238(spontaneous non-mucoidy mutant of YJK238) against the growth of *Listeria monocytogenes* Surfactin standard (sigma S-3523): 150µg loading

Table 3-10. Amino acid composition of anti-*listeria* lipopeptide by amino acid analysis and TOCSY NMR analysis.

residue	21		23		26		Surfactin
	A.A.	NMR	A.A.	NMR	A.A.	NMR	
Leu	3-4	4	3-4	4	3	1	4
Val	0	1	1	1	0	1	1
Asp	1	1	1	1	1	1	1
Glu	1	1	1	1	1	1	1
Ala	1	0	0	0	0	2	0
Pro	0	0	0	0	0	1	0

23 TOCSY

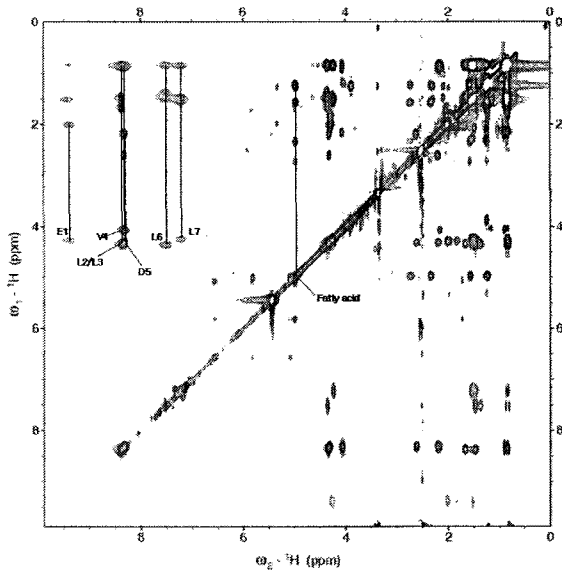


Figure 3-11. TOCSY spectrum of # 23 lipopeptide.

결론적으로 *Bacillus subtilis* JKK238가 생산하는 3종의 anti-*listeria* lipopeptide중 두개(22, 23번)는 생체정제로 이미 잘 알려진 surfactin임을 확인하였다. 특히 22번의 경우 1,018의 분자량은 기 보고된 Iturin계 화합물에서는 찾을 수 없는 새로운 Iturin A 유사체임이 유력하다. 26번의 경우 새로운 상기에서 지적한대로 새로운 신규의 lipopeptide일 가능성을 배제할 수 없으며 이것은 현재 정밀 실험중에 있으므로 추후 결과를 알 수 있으리라 생각된다. 또한 상기 결과에서 기술되었듯 상용화된 surfactin 표품은 고농도에도 항균활성이 매우 약한데 최근에 iturin A의 구성 아미노산 중 leucine 하나만 대사공학적으로 제거된 hexapeptide가 강한 항 세균능을 보여준다는 보고는 매우 흥미있는 것이다(H. Symmank 등, 2002)

다. 항진균 유전자군의 분리 및 구조분석

1) *Bacillus* sp. JKK238의 유전자은행 제작

공시균주인 *Bacillus* sp. JKK238균주의 유전자 은행을 제작하기 위해 두 종류의 벡터를 사용하여 행하였다. 하나는 high copy인 Supercos이고 다른 하나는 single copy인 Epifos이다. 이 두 벡터 모두 30 Kb이상의 삽입단편이 적재 가능하도록 설계되어 있다. Supercos library의 경우 10,000여주 확보되었으나 그 중 DNA삽입율이 60%미만으로 양질의 library를 얻지 못했다. 그러나 Epifos library의 경우, 다양한 단편의 삽입율이 90%이상인 15,000여 클론을 성공적으로 확보하였다. Figure 3-12는 주사기(주사바늘 18 gage)로 genomic DNA를 왕복회수별로(0, 1, 2, 3, 4, 5회) shearing하여 전기영동한 결과인데 이중

lane3(2회) 시료를 filling-in 시키기 위한 재료로 사용하였고 Figure 3-13그림3은 Epifos library clone들에서 무작위로 선발하여 plasmid를 추출하여 삽입단편의 크기와 다양성을 검정하였는데 보시는 바와 같이 매우 다양한 크기의 큰 단편들이 삽입되었음을 확인하였다.

CT 0, 1, 2, 3, 4, 5회

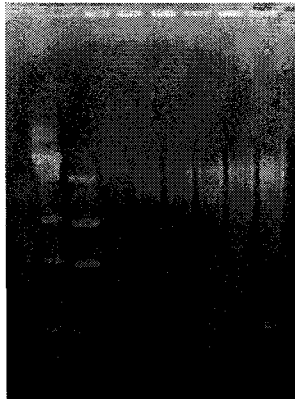


Figure 3-12. Genomic DNA의 shearing pattern. CT: λ /HindIII DNA marker

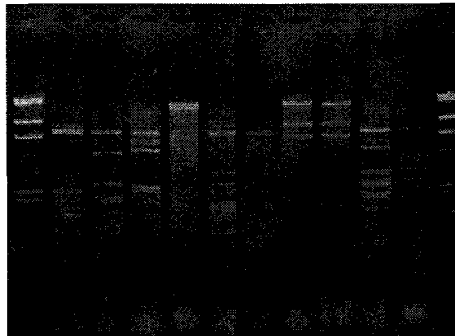


Figure 3-13. Epifos library 클론들의 삽입단편확인 (EcoRI + HindIII cut)

2) 유전자은행으로부터 항 진균 Iturin 유전자 보유 클론의 선발

Epifos Library 1,500 클론들을 제 1 세부과제에서 PCR에 의해 분리된 유전자 Iturin B 및 C유전자단편(800bp, 500bp)을 동위원소 P32로 라벨하여 colony hybridization을 행한 결과 Figure 3-14과 같이 총 19클론의 positive 클론을 선발하였다. 이것은 JKK238이 생산하는 항 진균 펩타이드의 주 유효물질이 *Bacillus subtilis*에서 기 보고된 Iturin일 것이라는 1차 년도의 추정과 2차 년도의 Iturin 존재에 대한 구조분석 실험 결과를 확실히 증명하는 또 하나의 자료가 된다. 이들 클론들의 항 진균 유전자군의 발현 가능성을 확인하기 위해서 이들 총 19클론들은 모두 TSB액체배지에 접종하고 37°C에서 3일간 배양하고 0.45 μ m syringe filter로

제공하여 각 배양액을 200 μ l씩 항균배지에 loading하고 최적온도에서 하룻밤 배양하여 저해대를 관찰하였으나 어떠한 가시적인 항균활성을 가진 클론도 선발할 수 없었다. 이것은 대장균에서 *Bacillus* 유래 유전자군의 전사가 이루어지지 않거나, 분비 및 이전 시스템이 맞지 않아 유전자 군이 존재함에도 항균물질을 생산 못하는 경우, 또는 이것의 항균유전자가 대장균에 치사적인 기능 발현을 하여 클론으로 존재 못하는 경우를 추정할 수 있다.

한편 이들 중 9 클론들의 재조합 plasmid를 분리하여 *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III로 잘라 종합 분석하면(Figure 3-15), 이들 재조합 plasmid는 크게 4그룹으로 구분되는데(1그룹;96, 268클론, 2그룹;318클론, 3그룹;582, 583클론은 동일클론임, 4그룹;550, 635, 689, 766) 이들 그룹내의 클론들은 적어도 하나 이상의 동일한 큰 단편을 공유하는 것으로 보인다.

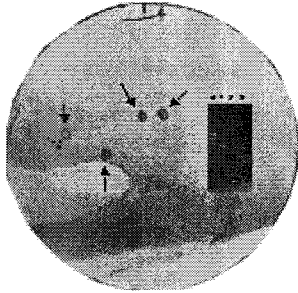


Figure 3-14. 유전자은행으로부터 Iturin 유전자 단편보유 클론의 colony hybridization에 의한 선발. 사용한 Probe DNA단편은 IturinB 및 C의 부분클론.

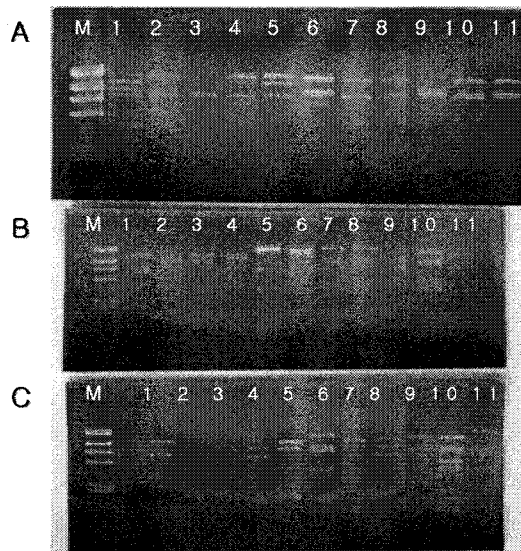


Figure 3-15. Iturin 보유 유전자 클론의 확인(A: *Bam*HI, B: *Eco*RI, C: *Hind*III). M; λ /*Hind*III DNA marker 1; YA32, 2; YA96, 3; YA252, 4: YA268, 5; YA318, 6; YA550, 7; YA582, 8; YA583, 9; YA635, 10; YA689, 11: YA766.

3) 유전자 은행 클론들의 항균성 검정

Iturin유전자 보유 클론들의 JKK238이 생산하는 항균유전자를 선별하기 위해서 공시 지시병원균 3종을 대상으로 3,000여 주 이상의 library 클론 균주에서 항균저지대 유무로 직접 1차 선별하는 실험을 행하여, 5주의 후보 클론을 1차 선별하고 이것을 3일간 배양한 액으로 2차 검정하여 *Listeria*에 성장저해 양상을 보이는 YA32클론을 최종 선별하였으나 수 십 차례의 반복실험에서 어떤 경우엔 항균성이 나타나나 어떤 경우에는 나타나지 않아 배양액상에서 일정한 항균성의 재현성이 확보되지 않은 실정이다. 이 클론의 불규칙한 항균성의 출현이 우리가 모르는 배양조건의 미세한 차이에 기인하는 것인지 pseudo screening인지는 구분되지 않은 상태이다. 한편 이 클론의 삽입 단편은 약 30 kb정도로 추정된다(Figure 3-16). 이들 삽입단편을 EcoR1 및 HindIII로 부분double digestion하여 *Bacillus subtilis*-*E. coli* shuttle vector인 pHY300PLK의 EcoR1 및 HindIII double cut 말단부에 subcloning하여 삽입단편이 10kb인 pHY32A 클론을 얻었으며 이 클론의 배양액 역시 불규칙한 항균성이 있음을 확인하였다(미공개자료). 그리고 이 삽입단편 내에 Iturin B 유전자 단편이 포함되지 않음을 southern hybridization 실험으로 확인할 수 있었다(Figure 3-17). Gene jumper를 통한 부분적 염기서열 분석은 이들 클론이 *Bacillus subtilis* 168유래의 polyketide synthase typeI과 55-92% 상동성을 보여주어 이 클론의 항균성이 polyketide계열의 항생제에 일부 기인할 수도 있다고 추정된다.

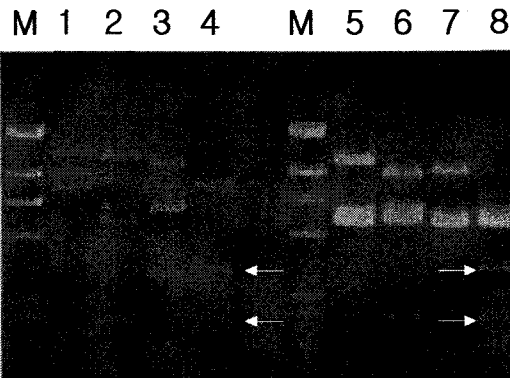


Figure 3-16. YA32 및 pHY32 클론의 삽입 단편 분석. M: λ /HindIII marker, 1: BamHI/YA32, 2: EcoRI/YA32, 3: HindIII/YA32, 4: EcoRI+HindIII/YA32, 5: BamHI/pHY32, 6: EcoRI/pHY32, 7: HindIII/pHY32, 8: EcoRI+HindIII/pHY32. 화살표는 subclone에 삽입된 단편.

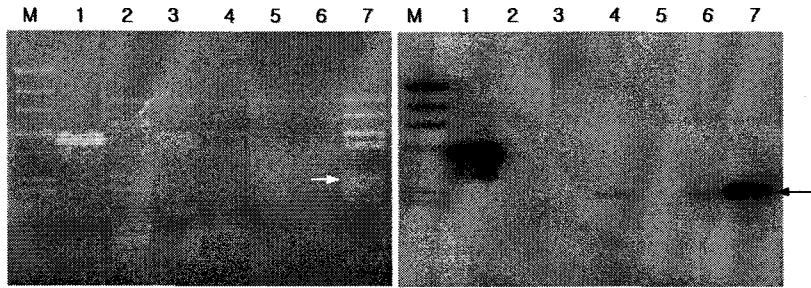


Figure 3-17. Southern hybridization에 의한 후보 클론의 iturin 유전자 보유 확인(EcoRI + HindIII). M: λ /HindIII DNA marker, 1: Iturin 보유 plasmid, 2: YA32, 3: YA42, 4: YA252, 5: YA273, 6: YA583, 7: YA689.

4) Iturin 유전자군 보유 YA550 클론의 염기서열 분석

iturin B와 C probe 유전자에 가장 강한 시그널을 보여주는 YA550의 삽입단편(약 35kb)에 대한 전체 염기서열을 분석하기 위해 short-gun 무작위 cloning 방법으로 얻은 클론들에 대해 6×sequencing을 시도하고 있는 중이다. 이 외에도 YA550의 16kb BamHI 단편을 pBR322에 subcloning하여 그 단편의 삽입을 확인하고(Figure 3-18) 그 클론을 YA152라 명명하였다. 이 subclone 역시 Figure 3-19에서 보는 바처럼 Gene jumper kit (Invitrogen)로 500 bp 간격의 변이주를 얻어 Kit에서 제공되는 primer를 이용해 동시에 염기서열을 분석한 결과 이들 삽입단편이 *Bacillus* 유래 Iturin A synthetase B와 C 유전자와 각각 94%, 96%의 상동성을 보여줌을 확인함으로써 JKK238균주가 항진균 peptide인 Iturin A를 생산함을 더욱 분명히 함을 보여준다. 또한 Figure 3-19의 Southern 분석은 YA152내에 Itu B와 C 유전자의 일부가 배열되어 있음을 보여주고 완전한 Iturin 유전자군의 배열은 YA550의 전체 염기서열이 이루어진다면 더욱 분명해질 것이다.

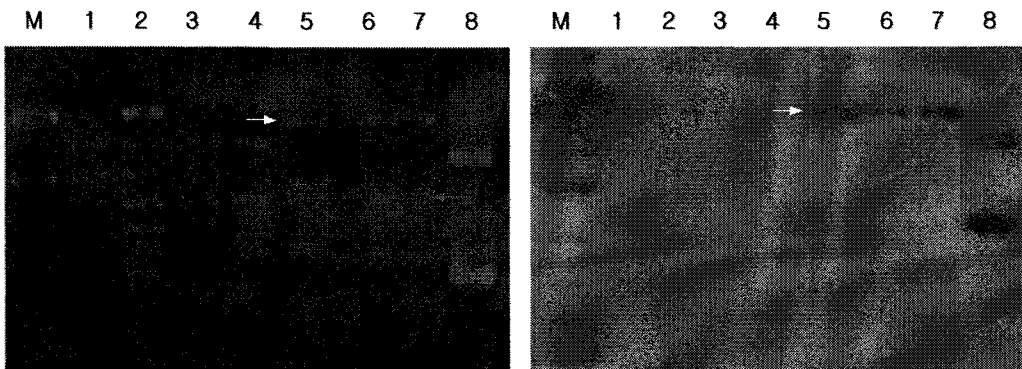


Figure 3-18. Iturin 보유 유전자 클론의 확인(BamHI 절단). M; λ /HindIII DNA marker, 1; YA32-2, 2; YA32-7, 3; YA252, 4; YA318, 5; YA550, 6; YA583, 7; YA689, 8; pHY32.

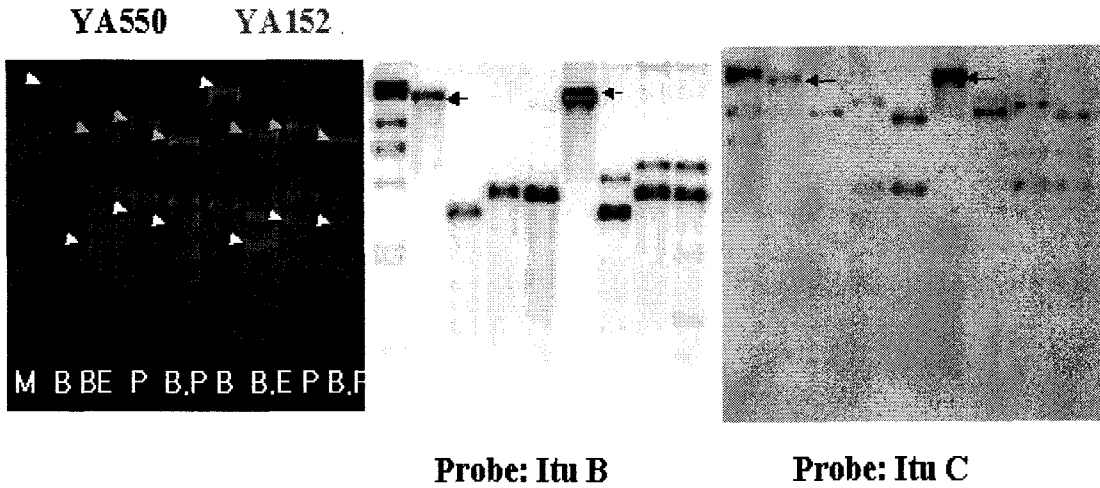


Figure 3-19. YA550 및 YA152 subclone의 iturin 유전자 보유 및 확인

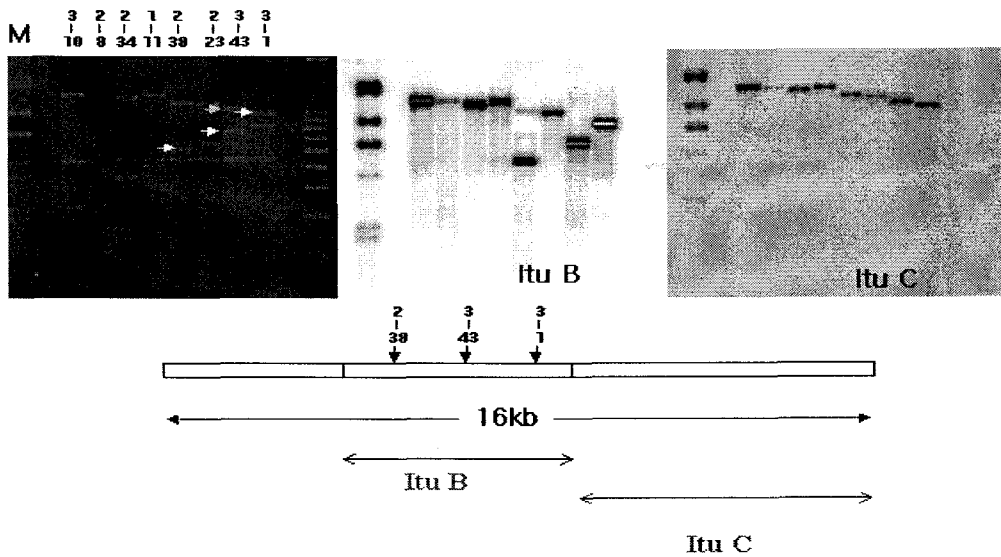


Figure 3-20. YA152클론의 Itu 유전자 배치

5) 향진균 펩타이드 Iturin 생합성유전자군의 분석

Bacillus subtilis JKK 238균주의 향진균, 항listeria, 항염증 활성의 유효물질이 이차 대사 산물의 lipopeptide임을 앞에서 설명하였다. 다수의 *Bacillus subtilis* 균들은 소위 lipopeptide 항생제라는 긴 지방산쇄를 가진 작은 peptide를 생산한다. 이들 화합물의 peptide 분자는 다기능의 peptide synthetase에 의해 non-ribosomally 생산되어진다. 이러한

non-ribosomally peptide는 항생제, 효소 저해제, 항암제, 항 바이러스, 면역조절제, 생체정제 등과 같은 다양한 생리활성을 가지고 있다. 보고에 의하면 펩타이드성 이차대사산물의 구성 요소로 약 300 여종의 유도화된 잔기가 존재한다고 한다. 일반적으로 이들 펩타이드는 구성 잔기와 펩타이드 사슬의 길이가 균주 종에 따라 다양하지만 그것의 생합성은 잘 보존된 염기 영역을 보유한 유사한 peptide synthetase가 관여하고 “multiple carrier thiotemplate mechanism”에 의해 주로 합성됨을 설명하고 있다. 이 기전에 따르면 다기능 효소의 각 도메인이 상응하는 acyladenylate 유도체로 활성화한 후 thioester 결합을 통해 보조인자와 공유결합된 특정 아미노산을 인지한다. 따라서 polypeptide chain의 길이 연장은 펩타이드 내 아미노산 결합이나 에스테르 결합의 동시적 형성과 일련의 thioester 결합 절단을 통해 일어난다. 생합성 마지막 단계에서 각 펩타이드는 synthetase 유전자내 code된 thioesterase 효소활성에 의해 방출되는 것으로 알려져 있다. 이러한 peptide synthetase는 아미노산 결합, 활성화, 메틸화, racemization, 사슬 절단과 같은 기능을 가진 부위들을 보유한 다기능의 복합효소이다. *Bacillus subtilis*에서 기 동정된 lipopeptide는 일반적으로 surfactin group, plipastatin-fengycin group, iturin group의 세 그룹으로 크게 구분될 수 있다. 최근에 식물병의 방제제로 이들 peptide가 관심을 끌고 있으며 특히 일본의 Shoda 등은 *B. subtilis* RB14의 식물병 원성 곰팡이균 저해가 Iturin A 생산에 기인함을 증명했으며 이들은 transposon mutant를 이용하여 이들 유전자를 분리, sequencing하였다.

본 연구의 공시균주인 *Bacillus subtilis* JKK238 균주 또한 강력한 항진균 펩타이드인 iturin A를 생산함이 확인되었기 때문에 우리는 이들 유전자의 염기서열과 domain 분석을 통해 유사 유전자의 상동성과 진화적 근연관계의 분석을 시도하였다. 따라서 상기 결과에서 Iturin 유전자군 보유가 확실한 YA550클론의 삽입DNA단편에 대한 전체 염기서열을 행하였다. 보다 빠른 염기서열분석을 위해 short-gun library를 제작하고 약 2kb 삽입단편을 보유한 subclon들을 6× 무작위로 선발하여 sequencing하였다. 여기서 중복염기서열을 가진 DNA단편 sequence들을 연결하여 38,561 bp를 가진 1개의 contig를 얻었으며 이를 통해 DNASTAR와 BLAST search를 통해 분석하였다. 그 결과 YA550클론은 Iturin A synthetase C의 완전한 ORF(7,853bp, 2,618아미노산)와 Iturin A synthetase B ORF의 16,088bp중 후반부 ORF 7,655bp를 보유함을 알 수 있었다. 따라서 우리는 *Bacillus subtilis* JKK238의 Iturin A 생합성유전자군의 완전한 염기서열 분석을 위해 Shoda등이 2001년 보고한 Iturin A 염기정보에 근거하여 인접한 PCR산물간 중복배열을 포함하는 0.8-1.2kb 간격을 가지도록 총 52종의 primer를 디자인하고 합성하였다(Figure 3-21의 0-24 kb까지 적색화살 방향). 이들 primer를 사용하여 최종 26종의 PCR산물을 분리하여 pGEM-T vector에 cloning하여 나머지 26 kb 가량의 Iturin A 유전자의 염기서열을 완료하였다. Figure 3-21에서 보는 바와 같이 Iturin A 유전자의 배열은 *B. subtilis* RB14의 배열과 일치하였고 각 해당하는 ORF의 유전자 homology 또한 아미노산 수준에서 97%이었다. 염색체내 이들 유전자의 위치 또한 xylonase D 유전자와 바로 인접해있음이 확인되었다. 여기서 RB14유래의 xylonase D 유전자와 JKK의 그것과 아미노산 수준에서 비교시에도 약 98%의 상동성을 보였다(Figure 3-22). 인접유전

자의 배치순서 또한 XynD, ynfF, bamR, bamK, glucanase 순으로 일치함을 알 수 있었는데 최근 다른 *Bacillus subtilis* AU195의 Bacillomycin D유전자의 염색체내 삽입위치와도 거의 동일함이 흥미롭다 그러나 이 균주의 Iturin계인 또 다른 antifungal lipopeptide Bacillomycin D의 아미노산의 일부가 Iturin A와 다름에 비추어 보아 bam B의 후반부와 bam C의 해당 아미노산을 code하는 module의 conservative domain부분이 상동성재조합에 의해 itu B와 itu C의 ORF와 대체되었을 가능성을 시사해준다. 왜냐하면 이들 내에 매우 상동성이 높은 sequence를 가진 여러 domain들이 존재하기 때문이다(Figure 3-23). 여기서 module은 펩타이드의 한차례 elongation에 필수적인 별개의 효소를 포함하는 단위이다. 이러한 elongation module은 세 개의 domain으로 구성되어있다. 즉 기질의 인지와 활성화에 관한 adenylation domain(A domain; AMP binding site 포함), 활성화된 아미노산과 elongation intermediates을 4-phosphopantothein (PP)에 thioester형태로 결합하는 thiolation domain (T domain; PP binding site 포함), peptide 결합 형성을 촉매하는 condensation domain (C domain)이 있다. 그러나 첫 번째 아미노산을 제공하는 개시module은 C-domain이 없으며 펩타이드 합성이 끝나는 마지막 module은 thioesterase-like Te domain에 의해 peptide 합성이 완료된다. 이외에도 선택적으로 epimerization이나 N-methylation에 관여하는 domain이 module에 존재할 수 있다. Figure 3-24와 3-25는 여러 미생물에서 기 보고된 Itu-C와 유사 기능 유전자 및 이들의 thioesterase 영역들의 근연관계를 분석한 결과이다. Iturin계의 유사한 lipopeptide이지만 뚜렷이 근연도가 구분되어 나타나고 있다.

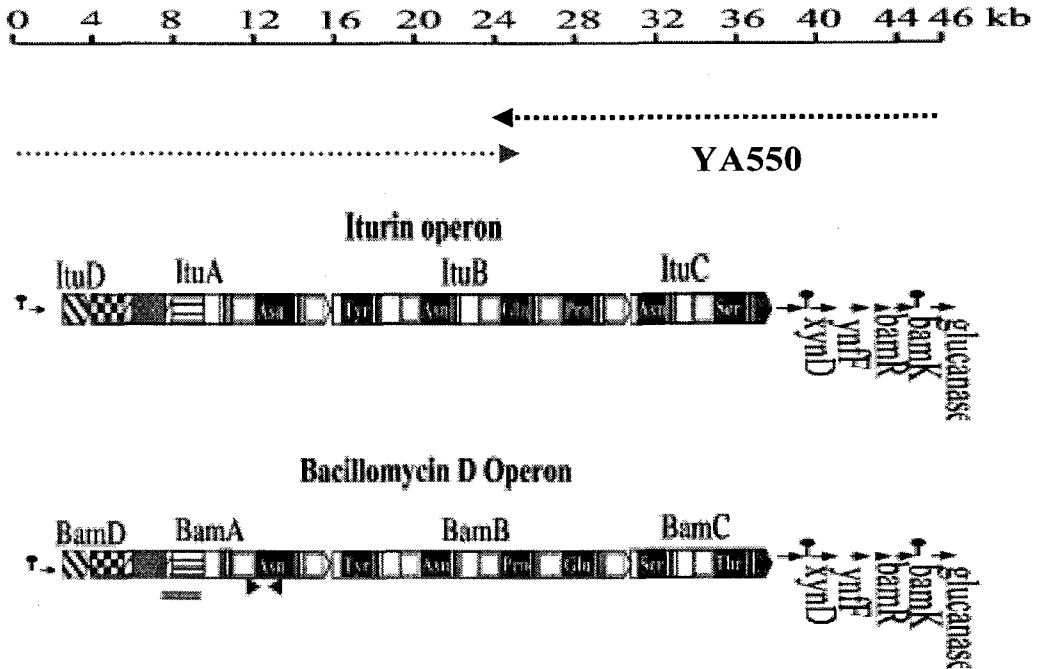


Figure 3-21. *Bacillus subtilis* 염색체내 Iturin A 및 Bacillomycin D operon의 유전자 배열과 인접유전자 배치도

jdkkxynd	M C K K C C V C L W V L A L L L S C F T G K S A Y A A S T P	30
rb14xynd	M C K K C C V C L W V L A L L L S C F T G K S A Y A A S T P	30
jdkkxynd	I A K H V G N S N P L I D H H L G A D P F A L T Y N G R V Y	60
rb14xynd	I A K H V G N S N P L I D H H L G A D P F A L T Y N G R V Y	60
jdkkxynd	I Y M S S D D Y E Y N S D G T I K D N S F A N L N K I S V I	90
rb14xynd	I Y M S S D D Y E Y N S D G T I K D N S F A N L N K I S V I	90
jdkkxynd	S S A D M V N W T D H G A I P A A G A N G V N G G R G I A K	120
rb14xynd	S S A D M V N W T D H G A I P A A G A N G A N G G R G I A K	120
jdkkxynd	W A G A S W A P S A A V K K I N G K D K F F L Y F A N G G G	150
rb14xynd	W A G A S W A P S A A V K K I N G K D K F F L Y F A N G G G	150
jdkkxynd	G I G V L T A D S P T G P W T D P I G K P L V T P S T P G M	180
rb14xynd	G I G V L T A D S P T G P W T D P I G K A V V T P N T P G M	180
jdkkxynd	S G V V W L F D P A V F V D D D G T G Y L Y A G G G V P G G	210
rb14xynd	S G V V W L F D P A V F V D D D G T G Y L Y A G G G V P G G	210
jdkkxynd	S N P T Q G Q W A N P K T A R V M K L G P D M T S V A G S A	240
rb14xynd	S N P T Q G Q W A N P K T A R V M K L G P D M T S V A G S A	240
jdkkxynd	S T I D A P F M F E D S G M H K Y N G K Y Y Y S Y C I N F G	270
rb14xynd	S T I D A P F M F E D S G M H K Y N G K Y Y Y S Y C I N F G	270
jdkkxynd	G A H P A D K P P G E I G Y M T S S S P M N S F S Y R G H F	300
rb14xynd	G A H P A D K P P G E I G Y M T S S S P M G F F S Y R G H F	300
jdkkxynd	L K N P G A F F G G G N N H H A V F N F K N E W Y V V Y H	330
rb14xynd	L K M P G A F F G G G N N H H A V F N F R N E W Y V V Y H	330
jdkkxynd	T Q T V S S A L Y G A G K G Y R S P H I N K L V H N P D G S	360
rb14xynd	T Q T V S S A L Y G A A K G Y R S P H I N K L V H N P D G S	360
jdkkxynd	L Q E V A A N F A G V K Q L S N L N P Y N R V E A E T F A W	390
rb14xynd	L Q E V A A N F A G V K Q L S N L N P Y N R V E A E T F A W	390
jdkkxynd	N G R I L T E A S S A P G G P V N N Q H V T N I H N G D W I	420
rb14xynd	N G R I L T E A S S A P G G P V N N Q H V T N I H N G D W I	420
jdkkxynd	A V G N A D F G S G G A R T F K A N V A S A L G G R I E V R	450
rb14xynd	A V G N A D F G S G G A R T F K A N V A S A L G G K I E V R	450
jdkkxynd	L D S A N G K L V G T L N V P S T G G T Q S W R E I E T A V	480
rb14xynd	L D S A N G K L V G T L N V P S T G G T Q S W R E I E T A I	480
jdkkxynd	S G A S G V H N V F F V F T G T G T G N L F N V D Y W Q F T	510
rb14xynd	S G A T G V H N V F F V F T G T G T G N L F N V D Y W Q F T	510
jdkkxynd	Q R	512
rb14xynd	Q R	512

Figure 3-22. *Bacillus subtilis* JKK238과 RB14 균주간 xylanase D유전자의 상동성 비교



RB-ITU-C 290-687 770-833 845-1148 1314-1615 1800-2209 2293-2357 2380-2587

AMP-Binding Domain

JKK-ITU-C	E D G S D L E P I S S T K D L A Y V I Y T S G S T G K P K G	420
RB-ITU-C	E D G S Y L E P I S S T K D L A Y V I Y T S G S T G K P K G	420
AU195-BAM-C	E D G S N V E P A A G P D H L A Y V I Y T S G S T G K P K G	417
BAFZB-BMY-C	E D G S N V E P A A G P D H L A Y V I Y T S G S T G K P K G	417
6633-MYC-C	E D G S N L E S I S G P N Q L A Y V I Y T S G S T G K P K G	416

AMP-Binding Domain

JKK-ITU-C	L D T I A Q K N - V T V M H F V P A M L H A F L E S M E Q K	2025
RB-ITU-C	L D T I A Q K N - V T I M H F V P A M L H A F L E S M E Q K	2025
AU195-BAM-C	L Q - L L K S E A V T I L N Q T P S Y F Y Q L M Q E E R A D	2030
BAFZB-BMY-C	L Q - L L K S E A V T I L N Q T P S Y F Y Q L M Q E E R A D	2030
6633-MYC-C	L S S I I E D S R V D I I K L T P A H L - Q L L K E M N I S	2022

PP-Binding Domain

JKK-ITU-C	D S I K S I Q V T S S L Y Q A G Y K L D I K H L F K H P T I	826
RB-ITU-C	D S I K S I Q V T S S L Y Q A G Y K L D I K H L F K H P T I	826
AU195-BAM-C	D S I K S I Q V S S R L Y Q A G Y K F E I K H L F K Y P T I	835
BAFZB-BMY-C	D S I K S I Q V S S R L Y Q A G Y K F E I K H L F K Y P T I	835
6633-MYC-C	D S I K S I Q V S S R L Y Q A G Y K F E I K H L F K Y P T I	832

PP-Binding Domain

JKK-ITU-C	Q L A D I W K D I L A L P D P G I K D H F F D V G G H S L K	2323
RB-ITU-C	Q L A D I W K D I L A L P D P G I K D H F F D V G G H S L K	2323
AU195-BAM-C	Q L A E I W K N I L A L S D P G I K D N F F D V G G H S L K	2320
BAFZB-BMY-C	Q L A E I W K N I L A L S D P G I K D N F F D V G G H S L K	2320
6633-MYC-C	Q L A E I W K E V L A H S E L G I K D N F F D V G G H S L K	2311

Condensation Domain

JKK-ITU-C	I H H L V V D G V S W R I L L E D I T S A Y E Q L Q N G E A	1006
RB-ITU-C	I H H L V V D G V S W R I L L E D I T S A Y E Q L Q N G E A	1006
AU195-BAM-C	V H H L V I D G V S W R I L L E D I A A A Y E Q L Q N G E A	1015
BAFZB-BMY-C	V H H L V I D G V S W R I L L E D I A A A Y E Q L Q N G E A	1015
6633-MYC-C	A H H L V I D G V S W R I L I E D I A A A Y E Q L L N G E A	1012

Condensation Domain

JKK-ITU-C	Q T V L L K E P V S N Q A K G Y Q K Q R L A C R L G K Q L S	1546
RB-ITU-C	Q T V L L K E P V S N Q A K G Y Q K Q R L A C R L G K Q L S	1546
AU195-BAM-C	Q T V L L Q E Q S S D R A K G Y E K G E H E F R L G K R L T	1553
BAFZB-BMY-C	Q T V L L Q E Q S S D R A K G Y E K G E H E F R L G K R L T	1553
6633-MYC-C	Q T V L L K E P F S D Q A R G Y Q K Q K L A C R L G K Q L T	1548

Figure 3-23. *Bacillus* 균주의 Iturin A synthetase C ORF의 domain 배열 및 상동성
 * JKK, RB, AU, ATCC6633은 *Bacillus subtilis* 균주이고 BAFZB는 *Bacillus amyloliquefaciens* 임)

MSEFKQQLLFGMKNFHTEDRSEAFPFQVQ	30	JKK-ITU-C	GQFDQDFENGGIEVSPYSGGKIASDRHP
MSEFKQQLLFGMKNFHTEDRSEAFPFQVQ	30	RB-ITU-C	GQFDQDFENGGIEVSPYSGGKIASDRHP
DSTVKRDLITSGSDCIHSSLSAIVERRILTM	60	JKK-ITU-C	YTLGINGMISDGRSLAISYSGKOYRRRTM
DSTVKRDLITSGSDCIHSSLSAIVERRILTM	60	RB-ITU-C	YTLGINGMISDGRSLAISYSGKOYRRRTM
TNCTFMAYVLLVGLGIESLLYKYTGDEGV	90	JKK-ITU-C	ETCAALLKNSLKEVIERKCAQAEHHLTFS
TNCTFMAYVLLVGLGIESLLYKYTGDEGV	90	RB-ITU-C	ETCAALLKNSLKEVIERKCAQAEHHLTFS
TGVPTVFEDEDEDLASDQMLLIKQNHSSG	120	JKK-ITU-C	IFLKDITIEFLDQFVQQTQHIHGEINIP
TGVPTVFEDEDEDLASDQMLLIKQNHSSG	120	RB-ITU-C	IFLKDITIEFLDQFVQQTQHIHGEINIP
TFKSIIFHELLKHTLDEAAILVQCVFEDKMA	150	JKK-ITU-C	TFMCKGMLFHLSDSASKAYFEGALVFDL
TFKSIIFHELLKHTLDEAAILVQCVFEDKMA	150	RB-ITU-C	TFMCKGMLFHLSDSASKAYFEGALVFDL
LRLNYNANHLPITIHVVSLEQIHSDGFFIET	180	JKK-ITU-C	GLDIAKAPFMSLSQLAEKRETLKTRFTY
LRLNYNANHLPITIHVVSLEQIHSDGFFIET	180	RB-ITU-C	GLDIAKAPFMSLSQLAEKRETLKTRFTY
AAADALFQFAMGEDLIQLKLCFNEQVYDRQ	210	JKK-ITU-C	QQLQIVFRKKKIEITVEDIKSMKNQRNE
AAADALFQFAMGEDLIQLKLCFNEQVYDRQ	210	RB-ITU-C	QQLQIVFRKKKIEITVEDIKSMKNQRNE
YMMQVIGLHNRLLFSVILFQFLPIGVFILL	240	JKK-ITU-C	FIAQFVQKCKKAKGFTLQDALMRYVILRTE
YMMQVIGLHNRLLFSVILFQFLPIGVFILL	240	RB-ITU-C	FIAQFVQKCKKAKGFTLQDALMRYVILRTE
PESETHLLVDLQTAKTETFRDKTYVQLFE	270	JKK-ITU-C	DDQVRLINSEPHHILMDGWCFLITNEVFET
PESETHLLVDLQTAKTETFRDKTYVQLFE	270	RB-ITU-C	DDQVRLINSEPHHILMDGWCFLITNEVFET
EOMKRTPDQAAAVTYGKQETTYKQLNERAW	300	JKK-ITU-C	VYALIKRRLKAEFTVITFYRYIEWLQDQD
EOMKRTPDQAAAVTYGKQETTYKQLNERAW	300	RB-ITU-C	VYALIKRRLKAEFTVITFYRYIEWLQDQD
LARTLRKKGVTDRALTAIICEHEIELVVGI	330	JKK-ITU-C	KHRAEAYWQYLDGVEGQTVLLKEPVSNQAK
LARTLRKKGVTDRALTAIICEHEIELVVGI	330	RB-ITU-C	KHRAEAYWQYLDGVEGQTVLLKEPVSNQAK
LAVLKAGGAYVPIEDFYPKHAIOYIVEDSG	360	JKK-ITU-C	GYYKQPLACLKGLKQSEETIKTASKNHVTY
LAVLKAGGAYVPIEDFYPKHAIOYIVEDSG	360	RB-ITU-C	GYYKQPLACLKGLKQSEETIKTASKNHVTY
ADHILTCQHLQKQLELAGTMVFLDQESSYH	390	JKK-ITU-C	NTEIQFANGLLQRYNNSQDVFVGSVYSGR
ADHILTCQHLQKQLELAGTMVFLDQESSYH	390	RB-ITU-C	NTEIQFANGLLQRYNNSQDVFVGSVYSGR
EDGSDLEPISSTKDLAVVLYTSGTGKPKG	420	JKK-ITU-C	FAEITFGIENVGLFNTIPVKTIAQGGMTV
EDGSDLEPISSTKDLAVVLYTSGTGKPKG	420	RB-ITU-C	FAEITFGIENVGLFNTIPVKTIAQGGMTV
VAIHQGLTNYIKWARRVYVKEKTNFEELY	450	JKK-ITU-C	EQVLMKSGECALASQVYDTFFLYEIQATE
VAIHQGLTNYIKWARRVYVKEKTNFEELY	450	RB-ITU-C	EQVLMKSGECALASQVYDTFFLYEIQATE
SSIAFDLIVSVETELITGNLIVYGGENS	480	JKK-ITU-C	KKQCLISHIMVVFENYFVEKQEMHKFNDDA
SSIAFDLIVSVETELITGNLIVYGGENS	480	RB-ITU-C	KKQCLISHIMVVFENYFVEKQEMHKFNDDA
ALLDLCTODFRILITIKLTFANLQLLKELH	510	JKK-ITU-C	LDIHFHMESEHYEYDFNFIYVMEAGRIDH
ALLDLCTODFRILITIKLTFANLQLLKELH	510	RB-ITU-C	LDIHFHMESEHYEYDFNFIYVMEAGRIDH
IPAECTIRKLVIGGDNLSLRLARISGKFG	540	JKK-ITU-C	VYNSVYVDHASVKKRMEGHFMQIKQMVNSQ
IPAECTIRKLVIGGDNLSLRLARISGKFG	540	RB-ITU-C	VYNSVYVDHASVKKRMEGHFMQIKQMVNSQ
GKIEIFNEYGPTETVYVGCMIYSPDQNDRA	570	JKK-ITU-C	ALRVQDLIDLTGDERSLLEAFENDTEADYP
GKIEIFNEYGPTETVYVGCMIYSPDQNDRA	570	RB-ITU-C	ALRVQDLIDLTGDERSLLEAFENDTEADYP
FSVPIGTAAADNMNIFVLDKSMKPVVAGVFC	600	JKK-ITU-C	KEKTIHGLFEEQAKRTFDQTAVVYGEFOLT
FSVPIGTAAADNMNIFVLDKSMKPVVAGVFC	600	RB-ITU-C	KEKTIHGLFEEQAKRTFDQTAVVYGEFOLT
EYISGEDIARGLNKAELTAERFLQHFV	630	JKK-ITU-C	RELDNERANQLARLQSEGEVQDFQVVGIMA
EYISGEDIARGLNKAELTAERFLQHFV	630	RB-ITU-C	RELDNERANQLARLQSEGEVQDFQVVGIMA
FEVKMYRGGDLAARLFDGNIIEYLRIDHGV	660	JKK-ITU-C	KSLKEMIVGLFGLKAGGAYVPIEDFVFE
FEVKMYRGGDLAARLFDGNIIEYLRIDHGV	660	RB-ITU-C	KSLKEMIVGLFGLKAGGAYVPIEDFVFE
KINGYRIEIGEVESAFFQIPPIQELVTAQ	690	JKK-ITU-C	SHVYLLDSDTKLLVLSHSLKSVPTFGKV
KINGYRIEIGEVESAFFQIPPIQELVTAQ	690	RB-ITU-C	SHVYLLDSDTKLLVLSHSLKSVPTFGKV
ETHGETSLCAYVTAQHSLTAGEIREHLSRQ	720	JKK-ITU-C	LJLEEFVRFSEWDGSKNLKQTAGFNHLLAYVY
ETHGETSLCAYVTAQHSLTAGEIREHLSRQ	720	RB-ITU-C	LJLEEFVRFSEWDGSKNLKQTAGFNHLLAYVY
LFSPYMIAPVYVQAAMPYLSNGKIDRCALP	750	JKK-ITU-C	TSGSTGRPKGVVHRSVINRLVMMQELHYE
LFSPYMIAPVYVQAAMPYLSNGKIDRCALP	750	RB-ITU-C	TSGSTGRPKGVVHRSVINRLVMMQELHYE
APFGHILGHPYAFRTELEKILAGVWESVL	780	JKK-ITU-C	LDKQVILQKTFITFDVSVMLFPMWMTGS
APFGHILGHPYAFRTELEKILAGVWESVL	780	RB-ITU-C	LDKQVILQKTFITFDVSVMLFPMWMTGS
GAEQVGIIDHFFELGGDSIKSIQVTSSELY	810	JKK-ITU-C	KAVLLHNGGKKNPDVLDITIAQKNVITMHP
GAEQVGIIDHFFELGGDSIKSIQVTSSELY	810	RB-ITU-C	KAVLLHNGGKKNPDVLDITIAQKNVITMHP
AGYKLDIKHLFKRPTISGLAPFIEPVVTRIA	840	JKK-ITU-C	VFAMLRAPLESMEQKSEELKRLKLSKYY
AGYKLDIKHLFKRPTISGLAPFIEPVVTRIA	840	RB-ITU-C	VFAMLRAPLESMEQKSEELKRLKLSKYY
DQGEIKRATLLTQHWFFARQVDFPHHYN	870	JKK-ITU-C	FASGEALTFHVVAGFHRMLITPAGEAQITNL
DQGEIKRATLLTQHWFFARQVDFPHHYN	870	RB-ITU-C	FASGEALTFHVVAGFHRMLITPAGEAQITNL
OSVYLYFKGLDFKICVVMKKAENHDAJ	900	JKK-ITU-C	VCFTEATIDVSYFCEAGETLNSVPIGKFFJ
OSVYLYFKGLDFKICVVMKKAENHDAJ	900	RB-ITU-C	VCFTEATIDVSYFCEAGETLNSVPIGKFFJ
RMVYVQGRHEYEAKTSGISEGELFSLDVF	930	JKK-ITU-C	SNIGLYIVHFLSEYFQPLGVAGELCIAGDG
RMVYVQGRHEYEAKTSGISEGELFSLDVF	930	RB-ITU-C	SNIGLYIVHFLSEYFQPLGVAGELCIAGDG
LLEENHAEATIEIANDIQGSIHADGFLM	960	JKK-ITU-C	LARGYLNARFELTAERFAAHPFAGKRMVYR
LLEENHAEATIEIANDIQGSIHADGFLM	960	RB-ITU-C	LARGYLNARFELTAERFAAHPFAGKRMVYR
KLGLFCQDGDHLLIAHHLVVDQVSKRIL	990	JKK-ITU-C	GLARWLFBSNIEYLRQIDHQRVIRSVRIE
KLGLFCQDGDHLLIAHHLVVDQVSKRIL	990	RB-ITU-C	GLARWLFBSNIEYLRQIDHQRVIRSVRIE
LEDITSAYELQNGEALYLPKKTCSYLWVA	1020	JKK-ITU-C	SGEITAEQLQDLDVAKKAVVIATEKESKQL
LEDITSAYELQNGEALYLPKKTCSYLWVA	1020	RB-ITU-C	SGEITAEQLQDLDVAKKAVVIATEKESKQL
ERLHYAESPEFRAJNNQVLEQKKNISQCKL	1050	JKK-ITU-C	CAVYLGDESLNTAQLKRLHLLNLPYVYIFA
ERLHYAESPEFRAJNNQVLEQKKNISQCKL	1050	RB-ITU-C	CAVYLGDESLNTAQLKRLHLLNLPYVYIFA
PKDNEQETGLABKRETTIYQWTEEBETEHL	1080	JKK-ITU-C	VFVQVEKMPITANGKIDRKLAFAPGNSLIT
PKDNEQETGLABKRETTIYQWTEEBETEHL	1080	RB-ITU-C	VFVQVEKMPITANGKIDRKLAFAPGNSLIT
KKENRAYTDDINDLLTGLGMAYVKKITGHE	1110	JKK-ITU-C	GTEYDAPGTLTEKQLADIKKIDILALPEFQI
KKENRAYTDDINDLLTGLGMAYVKKITGHE	1110	RB-ITU-C	GTEYDAPGTLTEKQLADIKKIDILALPEFQI
EHYVHLEGRREIFQDQVIRVYVGFPTQ	1140	JKK-ITU-C	KRMFPDVGGRKLVYDGLIHQTNAGMGNH
EHYVHLEGRREIFQDQVIRVYVGFPTQ	1140	RB-ITU-C	KRMFPDVGGRKLVYDGLIHQTNAGMGNH
VFVFLCICADRDTSQIRVYVKEQKQIPCK	1170	JKK-ITU-C	VQAVYDFETIETMARAIQAAVFESETCHIV
VFVFLCICADRDTSQIRVYVKEQKQIPCK	1170	RB-ITU-C	VQAVYDFETIETMARAIQAAVFESETCHIV
GISYGLMKYSDRHKAFERTEGHEIETFNH	1200	JKK-ITU-C	FVKHNDGDSIFVFCFPLIGYGLVYHMAK
GISYGLMKYSDRHKAFERTEGHEIETFNH	1200	RB-ITU-C	FVKHNDGDSIFVFCFPLIGYGLVYHMAK

JKK-ITU-C	R L D G V S T I Y A A D F L E E P S H G K E I V D R Y A E S	2429
RB-ITU-C	R L D G V S T V Y A A D F L E E P S H E K E I V D R Y A E S	2430
JKK-ITU-C	M I S I Q E Q G P F V L L G Y S S G S N L A F E V A K A L E	2459
RB-ITU-C	M I R I Q E Q G P F V L L G Y S S G S N L A F E A A K A L E	2460
JKK-ITU-C	K R G R T V S D V I M L D S K I T D S V T H L S E E E I Q E	2489
RB-ITU-C	K R G R T V S D V I M L D S K I T T S V T H L S E E E I E E	2490
JKK-ITU-C	I V H L N M D I I P D Y Y R E I L T I P S I K D K I R G Y L	2519
RB-ITU-C	I V H L N M D I I P D Y Y R E I L T I P S I K D K I R G Y L	2520
JKK-ITU-C	A Y H N E L I N S G A V N A N I H H L L C G D V T D D R G W	2549
RB-ITU-C	A Y H N E V I N S G A V N A N I H H L L C G D V T D D R G W	2550
JKK-ITU-C	T Q S T A Q H Y L E Y K L K G D H V T I F E P H N I E E N T	2579
RB-ITU-C	T Q S T A Q H Y L E Y K L K G D H V T I F E P H N I E E N A	2580
JKK-ITU-C	D A I R S I I K R I E E R H H H G L V L E E Q L S I G S F A	2609
RB-ITU-C	E A I R S I I K R I E E R H H H G L V L E E Q L S M G S F A	2610
JKK-ITU-C	G D A K F D K M	2617
RB-ITU-C	G N T K F D N M	2618

Figure 3-25. *Bacillus subtilis* JKK238과 *Bacillus subtilis* RB14간의 Iturin A synthetase C의 염기서열.

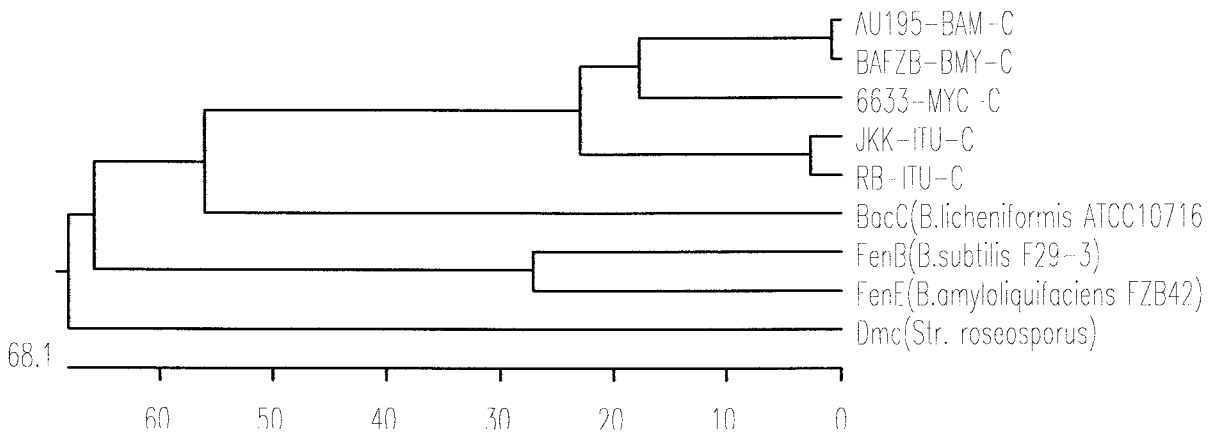
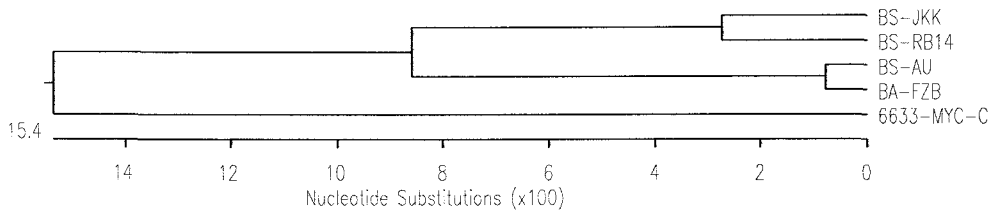


Figure 3-26. Itu C 및 이와 유사한 유전자간의 phylogenetic 분석

* JKK, RB, AU, ATCC6633은 *Bacillus subtilis* 균주이고 BAFZB는 *Bacillus amyloliquefaciens* 임)



JKK-ITU-C	A R A I Q A A V F E S E T D N - V F V K L N Q E D S I P V F	2382
RB-ITU-C	A R A I Q A A V F E S E T D H N V F V K L N Q E D S I P V F	2383
AU195-BAM-C	A R A I Q A A V F E S K T D N - V F V K M N Q N G S I P V F	2379
BAFZB-BMY-C	A R A I Q A A V F E S K T D N - V F V K M N Q N G S I P V F	2379
6633-MYC-C	A H A I Q A A A L P S K T E N - V F V K L N Q N G S I P V F	2370
JKK-ITU-C	C F P P L I G Y G L V Y N E M A K R L D G V S T I Y A A D F	2412
RB-ITU-C	C F P P L I G Y G L V Y N E M A K R L D G V S T V Y A A D F	2413
AU195-BAM-C	C F P P L I G Y G L V Y N E M A K R L A G R C T V Y A A D F	2409
BAFZB-BMY-C	C F P P L I G Y G L V Y N E M A K R L D G R C T V Y A A D F	2409
6633-MYC-C	C F P P L I G Y G L V Y N E M A N R L D G D C V Y Y A A D -	2399
JKK-ITU-C	L E E P S H G K E I V D R Y A E S M I S I Q E Q G P F V L L	2442
RB-ITU-C	L E E P S H E K E I V D R Y A E S M I R I Q E Q G P F V L L	2443
AU195-BAM-C	L E E P S Y E Q E I V D R Y A E S M I G I Q E Q G P F V L L	2439
BAFZB-BMY-C	L E E P S Y E K E I V D R Y A E S M I G I Q E Q G P F V L L	2439
6633-MYC-C	- E D P S Y K K P I I D R F A E S M I D I Q E Q G P F V L L	2428
JKK-ITU-C	G Y S S G S N L A F E V A K A L E K R G R T V S D V I M L D	2472
RB-ITU-C	G Y S S G S N L A F E A A K A L E K R G R T V S D V I M L D	2473
AU195-BAM-C	G Y S S G S N L A F E V A K A L E K R G R I V S D I M M L D	2469
BAFZB-BMY-C	G Y S S G S N L A F E V A K A L E K R G R I V S D I M M L D	2469
6633-MYC-C	G Y S S G S N L A F E V A K A L E Q R G R T V S D V I M L D	2458
JKK-ITU-C	S K I T D S V T H L S E E E I Q E I V H L N M D I I P D Y Y	2502
RB-ITU-C	S K I T T S V T H L S E E E I E E I V H L N M D I I P D Y Y	2503
AU195-BAM-C	S K R A V S V N Y F S E K E T E E I I H R N L D I I P D Y Y	2499
BAFZB-BMY-C	S K R A V S V N Y F S E E E T E E I I H R N L D I I P D Y Y	2499
6633-MYC-C	S Q I T T S V T H L S E K E V E E I I H L N L D I I P V Y Y	2488
JKK-ITU-C	R E I L T I P S I K D K I R G Y L A Y H N E L I N S G A V N	2532
RB-ITU-C	R E I L T I P S I K D K I R G Y L A Y H N E V I N S G A V N	2533
AU195-BAM-C	R E L L T I P S I K D K I R S Y L T Y H N K L I N S G A V N	2529
BAFZB-BMY-C	R E L L T I P S I K D K I R S Y L T Y H N K L I N S G A V N	2529
6633-MYC-C	R E L L T I P S I K E K I R G Y L A Y H N Q L I N S G T I N	2518
JKK-ITU-C	A N I H H L L C G D V T D D R G W T Q S T A Q H Y L E Y K L	2562
RB-ITU-C	A N I H H L L C G D V T D D R G W T Q S T A Q H Y L E Y K L	2563
AU195-BAM-C	A N I H H F L C G E L T D - R G W K Q S T A Q H Y F E Y K L	2558
BAFZB-BMY-C	A N I H H F L C G E L T D - R G W K Q S T A Q H Y L E Y K L	2558
6633-MYC-C	A N I H H L L C D D M T E - R G W T H S T A H N Y K E Y E L	2547
JKK-ITU-C	K G D H V T I F E P H N I E E N T D A I R S I I K R I E E R	2592
RB-ITU-C	K G D H V T I F E P H N I E E N A E A I R S I I K R I E E R	2593
AU195-BAM-C	K G D H V T I F D P H N I E E N T D T I R S I I K R I E E R	2588
BAFZB-BMY-C	K G D H V T I F D P H N I E E N T D T I R S I I K R I E E R	2588
6633-MYC-C	K G D H V T I F D P Q Y I E E N M S T I R S I M K C I E E Q	2577

Figure 3-27. Iturin A, Bacillomycin D, Mycosubtilin의 thioesrerase domain의 phygenic 분석 및 염기서열

* JKK, RB, AU, ATCC6633은 *Bacillus subtilis* 균주이고 BAFZB는 *Bacillus amyloliquefaciens* 임)

6) JKK238 균주의 형질전환

그람 음성균의 돌연변이 유기는 주로 Tn5를 많이 사용하나 그람 양성균에서는 Tn5가 작동되지 않으므로 Tn917이 가장 유력하며 *Bacillus*속에서 그 성공 사례가 많이 보고된 바 있다. Tn917 시스템을 이용한 대표적인 벡터는 pTV series이나, 본 실험에 사용된 transposon carrying 벡터로는 mini-Tn10(Cm)을 가진 pHV1048(8.4kb)과 Tn삽입부위의 인접 sequences의 self-ligated cloning이 가능한 Tn917ac1 (4.6 kb; Amp, Cm)을 운반하는 pD917(11.5 kb; Em)이었고 control plasmid는 *Bacillus subtilis* 벡터인 pUB110(Km, 5.4 kb)이었다.. 일반적으로 그람양성 세균의 electroporation에 의한 형질전환 효율은 그람음성 세균에 비해 매우 낮다. 특히 자연에서 분리된 균의 경우 더욱 낮은 경향이 있다. 짓갈에서 분리된 *Bacillus* sp. JKK238균주는 더욱이 매우 mucoid한 집락을 형성하므로 형질전환에 매우 난점이 많음을 예상할 수 있다. 우리는 JKK238 야생주와 야생주에서 자연발생적으로 나온 non-mucoid 변이주인 NJK238을 상기방법에 준해 electroporation을 위한 competent cell을 조제하여 형질전환 실험을 행하였다. 전기충격조건으로는 25 μ F, 200 Ω 으로 고정하고 전장 강도를 10 kV~22 kV/cm로 달리하여 형질전환 효율을 조사하였다. Electroporation cuvette은 전극 간격이 1 mm인 Bio-Rad사의 제품을 사용하고 동 회사의 Gene-Pulser에서 행하였다. 표 1에서와 같이 pUB110의 경우 non-mucoid 변이주는 mucoid한 wild type인 JKK238보다 300 배 이상의 형질전환 주의 출현이 있었다. 그러나 size가 큰 pHV1048과 pD917의 경우, 오히려 chloramphenicol(Cm) 저항성 균주가 적게 나타났으며 이들 균주 모두를 erythromycin첨가배지(Em; 5 μ g/ml)에서 항생제 내성을 검정한 결과 공시 Tn carrying plasmid의 존재를 간접적으로 시사하는 Cm과 Em 양 항생제에 모두 저항성을 가지는 균주는 단지 세 균주 이었다 [JKK238(pHV1248) 1주, JKK238(pD917) 2주]. 그러나 pUB110으로 형질전환된 Km 저항성 균주와는 달리, 이 균주들로부터 plasmid를 추출하여 전기영동한 결과, 형질전환 되었을 것으로 추정된 공시 Tn carrying plasmid의 존재를 전기영동상에서 확인할 수 없었다. 그러면 이들 균주의 양 항생제 내성이 어디에 기인하는지 의문스러우나 1997년 고 등은(한국농화학회지, 40권, 173page) 이와 동일한 현상을 보고하면서 electroporation시 공시 Tn carrying plasmid가 chromosomal DNA내로 multimerize되거나 integrate될 가능성을 언급한 바 있으므로 이 균주의 염색체 DNA 단편에 대한 Southern blot (probe DNA : pD917 EcoRI-HindIII 단편) 실험을 행했을 때 어떠한 시그널 밴드도 관찰할 수 없었다(미공개 자료). 그러나 Tn 변이주 제작은 생리활성 peptide의 생합성 유전자를 Tagging 하는데 핵심 연구전략이므로 우리는 원형질체 형질전환법이나, 적어도 3가지 화학적 competent cell제작에 의한 형질전환법, 기타 논문에 소개된 상기 방법이외의 3가지의 electroporation법을 모두 시도했으나 *Bacillus subtilis* JKK238에 Tn carrying plasmid (pHV1048과 pD917)을 형질전환 하는데 실패하였다. 위의 모든 방법에서도 형질전환 하고자 하는 plasmid의 크기가 6 kb이하일 때는 형질전환주를 얻을 수 있었으며 크기가 8 kb이상인 Tn carrying plasmid (pHV1048과 pD917)의 경우 host를 *Bacillus subtilis* MI113이나 ISW1214에 형질전환할 경우 비교적 많은 형질전환주를 얻을 수 있었다. 위의 결과에서 추론될 수 있는 사실은 JKK238균

주는 자체가 가지는 외래 DNA에 대한 restriction 작용때문이라기보다 대상 plasmid의 크기가 형질전환 효율에 결정적인 영향을 미치고 있다고 생각된다. 따라서 size가 작은(6 kb 이하) *Bacillus* 용 Tn carrying plasmid의 개발이 필요하다고 생각된다.

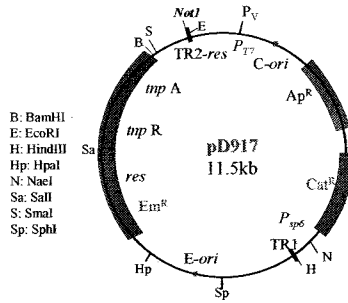


Figure 3-28. Tn917 acI을 운반하는 pD917 벡터.

Table 3-11. 전장 강도에 따른 JKK238의 전기충격 형질전환

균주	plamid종류	10kV	12kV	14kV	16kV	18kV	20kV	22kV
JKK238	pHV1248	2	6	2	1	7	3	0
	pD917	0	1	4	5	6	3	0
	pUB110	NT	NT	NT	NT	11	NT	NT
NJK238	pHV1248	0	0	1	0	2	0	0
	pD917	0	0	0	1	3	0	0
	pUB110	NT	NT	NT	NT	354	NT	NT

* 25μF, 200Ω NT: not tested

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

* 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전에서의 기여도 등을 기술

제 1 절 연구개발 목표 및 평가 착안점

1. 연구개발 목표, 개발 내용 및 범위

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2001)	<ul style="list-style-type: none"> - 균주 선발 및 형질전환 시스템 개발 - Tn 돌연변이주 선발 - 선발균주의 동정 - 유효기능 물질 분리, 정제 - 효능탐색 - 구조분석 - 작용기전 연구 	<ul style="list-style-type: none"> - 신기능 균주선발, 최적 형질전환 조건 분석 - 항균·약리성 Tn 변이주 선발 및 특성분석 - 분자생물학적, 생리, 생화학적 특성 분석에 의한 균주 동정 - 다양한 용매 및 크로마토그래피에 의한 분리 - 생리활성물질분획 항염증, 항암작용 탐색 - 유효물질의 구조 및 물성 연구 - 항염증, 항암작용기전 연구
2차 년도 (2002)	<ul style="list-style-type: none"> - 생합성 유전자 분리 - 유전자 구조 분석 - 활성물질 대량 생산 시스템 개발 - 효능탐색 - 구조분석 - 작용기전연구 	<ul style="list-style-type: none"> - 유전자 은행에서 관련 유전자군 분리 - 관련 유전자의 염기서열 분석 - 선발균주 생리활성물질 분획 및 항염증, 항암작용 탐색 - 유효물질의 구조 및 물성 연구 - 항염증, 항암작용 기전 연구
3차 년도 (2003)	<ul style="list-style-type: none"> - 유전자 기능 변환 및 효율적 발현 - 신기능 미생물 개발 - 효능탐색- 구조분석 - 작용기전연구 - 형질전환 시스템 연구 	<ul style="list-style-type: none"> - 유전자 변환 및 발현 벡터 개발 - 대량생산 연구 - 생리활성물질분획 항염증, 항암작용 탐색 - 유효물질의 구조 및 물성 연구 - 유효물질 항염증, 항암작용 기전 연구 - Bacillus의 효율적인 형질전환시스템 개발

2. 연구평가의 착안점

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척 도 (점수)
1차년도 (2001)	○ 균주분리 및 동정, 선발균주의 최적형질전환 조건확립, Tn돌연변이주 선발, 유효활성물질 분리정제	30
	○ NOS 억제력탐색 (Griess reagent assay) CAM assay	40
	○ 세포독성의 영향력탐색 (MTT assay) ○ RT-PCR, EMSA (NFκB shift assay)	30
2차년도 (2002)	○ 유전자은행 작성, 생합성유전자 분리, 염기 서열 결정, 돌연변이주와의 상보성 검증, 최적생산배양 조건 설정	30
	○ NOS 억제력탐색, CAM assay	40
	○ 세포독성의 영향력탐색 (MTT assay) apoptosis 효과탐색 (FACS analysis)	30
3차년도 (2003)	○ 신생혈관형성 관련 유전자 발현검색 RT-PCR, Northern Blot, Western blot EMSA (NFκB shift assay)	30
	○ 생합성유전자 기능분석, 유전자 변환 및 발현 벡터 개발, 신기능 미생물 개발	30
	○ NOS 억제력탐색 (Griess reagent assay) CAM assay, HUVEC cell culture 세포독성의 영향력탐색 (MTT assay) apoptosis 효과탐색 (FACS analysis)	40

제 2 절 연차별 연구개발 목표 달성도

1. 제 1 차년도

세부 연구 목표	진척도	내 용
제1세부과제 ○ NOS 억제력탐색 ○ 세포독성의 영향력탐색 ○ 생리활성물질의 특성규명 ○ CAM assay	100% 100% 100% 90%	JKK238배양액 부분정제 분획의 NOS억제력탐색 JKK238배양액 부분정제 분획의 세포독성효과 검증 JKK238배양액의 정성분석 검증 배양액 부분정제 분획의 물질 특성확인
제2세부과제 ○ RT-PCR (COX, NOS) ○ Western Blot ○ 생리활성 물질 생합성 유전자 분리	100% 90% 90%	COX2, iNOS 발현억제력 검색 항체 확보 Iturin A계열의 유전자 확보(ituB, ituC)
협동연구과제 ○ 생성 균주 1차 선발 ○ 형질전환 시스템 개발 ○ 유효물질 정제	100% 90% 100%	국내 전통 젓갈 및 전담 토양에서 분리한 세균 2,000여 주 분리: 항 진균 후보주 120주 1차 선발, 항염증 균주 선발 진행 B. subtilis 표준균주의 전기충격 형질전환법 시스템 확립: 공시 JKK238 균주의 최적 형질전환 조건 탐색 JKK238균주의 배양액으로부터 유효 항염증 물질의 정제 및 구조동정을 위한 시료 조제 완료

2. 제 2 차년도

세부 연구 목표	진척도	내 용
제 1 세부과제 ○ 유효물질의 항염증작용탐색 ○ 유효물질의 항암작용 탐색 ○ 항암, 항염증작용 물질의 분획과 분리	100% 100% 100%	Macrophage 세포에서의 iNOS 억제력 조사 (RT-PCR 및 rat paw edema test) 신생혈관생성 억제효과 조사(CAM assay), angiogenic polypeptide의 발현 정도 조사 (RT-PCR) 및 암세포에 대한 세포독성 조사 HPLC 및 MALDI-TOP MS를 통한 물질 규명
제 2 세부과제 ○ 유효물질 생산 조건 탐색 ○ 유효물질의 항염증, 항암기전연구 ○ 유효물질의 발현 조절 인자 탐색, 유전자 분리 ○ 유효물질 생산성 향상을 위한 균주의 형질전환 시스템 확립	100% 100% 100% 100%	유효물질 생산을 위한 균주의 배양 조건 확인 항염증, 항암 기전에 관여하는 요소에 대한 연구 유효물질 발현 조절 인자 중 3개 유전자 분리 (sigW, comA, abrB) 및 1개 유전자 부분 절편 분리(partial comP) 유효물질 생산성 향상에 필요한 유전자 도입을 위한 형질전환 벡터 시스템 개발
협동연구과제 ○ 유전자 은행 작성 ○ 변이주생성을 통한 활성물질 생합성 유전자 분리 ○ 유효물질의 구조동정	100% 90% 100%	세가지 종류의 생리활성 펩타이드를 생산하는 균주의 유전자은행 제작, 이로부터 항진균 유전자 Iturin 생합성 관련 유전자군의 분리 중 Tn변이주 확보를 통한 항염증 및 항Listeria 유전자의 추적 시험 수행 세 종류의 펩타이드를 정제하여 분자량을 확인, NMR분석을 통해 이들이 lipopeptide 계열의 물질임을 확인

3. 제 3 차년도

세부 연구 목표	진척도	내 용
제 1 세부과제 ○ 생리활성 물질의 항염증작용 기전 연구 ○ 생리활성물질의 항암작용 기전 연구 ○ 항염증, 항암 표지 유전자 발현 연구	100% 100% 100%	Macrophage cell line에서의 iNOS 억제력 조사 (MTT assay, RT-PCR) 신생혈관생성 억제효과 조사(CAM assay 및 tube formation assay), 암세포에 대한 세포독성 조사 iNOS 및 angiogenic polypeptide의 발현 정도 조사 (RT-PCR),
제 2 세부과제 ○ 생리활성물질 발현 조절 인자의 유전자 분리 ○ <i>Bacillus</i> 형질전환 벡터 및 시스템 개발 ○ 형질전환에 의한 균주 개량 연구	100% 100% 90%	유효물질 발현 조절 인자 중 3개 유전자 분리(sigW, comA, abrB) 및 Quorum sensing 유전자군 분리 (ComX, ComP, ComQ, ComA) 유효물질 생산성 향상에 필요한 유전자 도입을 위한 형질전환 벡터 시스템 개발(pHASH vectors) media change method 및 electrophoration에 의한 형질전환 시도
협동연구과제 ○ 생리활성물질 생합성 유전자군 구조 분석 ○ 발현시스템 개발 ○ 생리활성 펩타이드의 구조 분석	100% 90% 100%	유전자은행 제작 및 항진균 유전자 Iturin A 생합성 관련 유전자군의 분리 Tn변이주 확보를 통한 polyketide계 항생제의 생합성 유전자군 분리 세 종류의 lipopeptide를 정제, 분자량 확인, NMR분석 및 구조분석 수행

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 연구성과

1. 기술적 측면

한국산 전통 젓갈에서 분리한 *Bacillus* 속의 세균 생리활성물질에서 항염증성 또는 항암 물질의 탐색은 현재까지 시도된 바 없다. 본 연구팀이 확인한 성분 중 Bacitracin 과 surfactin 은 항염증 효과를 가지고 있는 것으로 확인 되었으며 이는 신규 치료제로 개발 가능성이 높다. 본 연구팀에서 탐색한 물질 중 surfactin 은 항염증 뿐만 아니라 항암 효과를 가지고 있는 것으로 결과가 나타나졌으며 이는 유효성과 안전성이 확보된 신규 항염증성 또는 항암물질의 개발 가능성이 높다고 본다.

Bacillus 속의 미생물에서 항염증 및 항암물질을 효과적으로 탐색, 분리하는 방법을 확립함으로써 이후 다른 미생물자원으로부터 생리활성물질의 탐색을 손쉽게 할 수 있을 것이다. 미생물을 이용한 신기능성물질의 대량생산방법을 개발하여 이의 대량생산의 방법과 농업적 이용을 위한 공정개발에 이용할 수 있을 것이다. 또한, 원천 신기능성물질의 지적 소유권 (물질, 용도, 제법 특허)을 확보할 수 있으며 신물질의 구조변환에 관련하는 핵심 기술을 확보할 수 있다.

2. 경제 · 산업적 측면

본 연구팀에 의해서 선발된 미생물 생리활성물질의 기능을 대별하면 다음과 같다. 첫째, 농업생산물에 해가되는 병원성 미생물에 정균 또는 살균능력이 입증되었다. 둘째로는 낮은농도에서 항염증작용기전을 나타내며, 농도의존적인 억제 효과를 확인하였다. 셋째로, 정상세포 보다는 암세포를 선택적으로 살상하는 능력을 보였다. 이상의 예비실험 결과로 보아 본 연구팀이 본격적으로 이 과제를 광범위하게 수행한다면 수종의 유효성분을 더 선발할 가능성이 높다 하겠다.

Bacillus 생리활성물질중의 한 성분은 식물성 병원미생물에 대한 저항성이 높아서 유가공제품 및 기타 식품의 보존제, 저장병 방제, 가축 및 양식 어류의 사료첨가제로의 광범위한 활용성도 기대된다. 결과적으로 농업생산품의 품질을 향상시켜 농업에 도움을 줄 것이다. 본 과제의 공시재료는 국내 고유 젓갈에서 분리된 세균에서 추출되어 이미 수행된 예비 실험에 의해 기존 항균펩타이드와는 구분되는 특징과 기능을 나타냈다. NOS활성 억제에 기인한 선택적 항염증작용을 하는 것으로 보아 소염 또는 항궤양제로서 이용 가치가 있을 것으로 추정되어 의약분야에의 파급효과가 기대된다. 현재 연간 생산액이 2000억원 정도를 차지

하는 이 분야 시장의 일부분을 점유할 후보물질로 개발할 수 있으리라 전망된다.

제 2 절 활용계획

선발된 신기능성 펩타이드를 항염증제 또는 항암제 등의 신약 개발에 이용할 수 있으며, 구조 및 작용기작의 연구로 새로운 항균, 항염증, 항암 생물신소재를 만들 수 있다. 이의 특허출원이 가능하며 항펩타이드의 구조가 신규일 경우 타용도로써도 이용개발이 가능하다. 본 연구에서 확립된 항염증성 펩타이드의 분리, 정제 시스템 및 항염증, 항암 물질의 활성 검색 시스템은 앞으로 다른 물질의 검색 시스템으로 직접 응용이 가능하다. 유효성분이 확인 선발되면 독성에 관한 전임상 실험 및 임상시험을 통하여 유효성과 안전성이 입증된 후 의약품으로 개발될 수 있을 것이다.

제 3 절 연구 성과 발표

1. 학술 대회 발표

Hwaseon Yi, Donghee Lee, Sungung Kang, Jeongmin Lee, Sang Hong Yoon, Moosik Kwon, Taeyoung Jung and Sungyoul Hong. Culture of *Bacillus* sp. Inhibits Nitric Oxide Production and Angiogenesis. 2003 Annual Meeting of Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology, May 15, 2003

Hwaseon Yi, Donghee Lee, Sungung Kang, Jeongmin Lee, Sang Hong Yoon, Moosik Kwon, Taeyoung Jung and Sungyoul Hong. Culture of *Bacillus* sp. Inhibits Nitric Oxide Production and Angiogenesis. 2003 Annual Meeting of European Society for Clinical Investigation, May 28, 2003

Seo-Young Kim, Choong-Eun Lee and Sugnyoul Hong. Surfactin inhibits human colon cancer cell growth via modulating cell cycle regulation. 2004 Annual Meeting of Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology, May 28, 2004

Donghee Lee, Jeongmin Lee, Tae Young Chung, Moosik Kwon. Studies of improvement of the production of useful secondary metabolites in *Bacillus subtilis* species, 2003 Annual meeting, bioexhibition & international symposium of the Korean Society for Microbiology and Biotechnology, June 24, 2003.

Yongdae Jeong, Donghee Lee, Jeongmin Lee, Tae Young Chung, Moosik Kwon. Cloning and Characterization of Genes for Transcriptional Regulators in *Bacillus Subtilis* Strain YJK238, The 61st annual meeting 2004, Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology, May 28, 2004

Yongdae Jeong, Donghee Lee, Jeongmin Lee, Tae Young Chung, Moosik Kwon. Cloning and Characterization of the Genes for Quorum Sensing in *Bacillus subtilis* Strain YJK238, 2004 New Challenges in Functional Microbiology and Biotechnology, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology, June 21, 2004

Sang-Hong Yoon. Bon-Sung Goo. Purification and characterization of three lipo-cyclopeptides produced by *Bacillus subtilis* JKK238 strain isolated from Korean Jeot-kal. 2004. 미생물.생명공학회 포스터 발표.

2. 논문 투고 준비 중

Hwaseon Yi and Sungyoul Hong. Inhibitory Activities of Surfactin on Nitric Oxide Synthesis and Angiogenesis.

Seoyoung Kim and Sungyoul Hong. Surfactin inhibits proliferation of human colon cancer cell via inducing cell cycle arrest and apoptosis.

Jeongmin Lee, Yongdae Jeong, Donghee Lee, Taeyoung Chung, and Moosik Kwon. Cloning and Characterization of the genes for quorum sensing in *Bacillus subtilis* sp. JKK238.

Sang-Hong Yoon. *Bacillus subtilis* JKK238로부터 항 listeria기능을 가지는 새로운 lipopeptide.

Sang-Hong Yoon. 새로운 iturin A의 구조 분석.

3. 특허출원 준비

항세균성 신규 peptide로 물질특허 1건

미생물 배양액으로부터 lipopeptide의 새로운 분리방법으로 제법 특허 1건

제 6 장 참고문헌

- Chang LK, Chang CL, Liu ST, 1994. Construction of Tn917ac1, a transposon useful for mutagenesis and cloning of *Bacillus subtilis* genes. *Gene* 150:129-134
- Chung WS and Ko YH, 1997. Transformation and mutation of *Bacillus licheniformis* 9945a producing γ -poly (glutamic acid), *Agric Chem Biotechnol* 40:173-177
- Chung YR, Kim CH, Chun J, 2000. *Paenibacillus koreensis* sp. nov., a new species that produces an iturin-like antifungal compound. *Int J Syst Evol Microbiol*, 50:1495-1500
- Crane BR, Arvai AS, Gachhui R, Wu C, Ghosh DK, Getzoff ED, Stuehr DJ, Tainer JA, 1997. The structure of nitric oxide synthase oxygenase domain and inhibitor complexes. *Science*, 278:425-431
- Dubnau D, Davidoff-Abelson R, 1971. Fate of transforming DNA following uptake by competent *Bacillus subtilis*, *J Mol Biol* 56:209-221
- Farrell AJ, Blake DR, Palmer RM, Moncada S, 1992. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 51(11):1219-1222.
- Grau A, Juan C. Gomez-Fernandez JC, Peypoux F, Ortiz A, 2001, Aggregational behavior of aqueous dispersions of the antifungal lipopeptide iturin A. *Peptides* 22:1-5
- Hamoen LW, Venema G, Kuipers OP, 2003. Controlling competence in *Bacillus subtilis*: shared use of regulators. *Microbiol* 149:9-17
- Hiraoka H, Ano T, Shoda M, 1992. Characterization of *Bacillus subtilis* RB14, coproducer of peptide antibiotics iturin A and surfactin. *J Gen Appl Microbiol* 38:635-640
- Hiraoka H, Ano T, Shoda M, 1992. Molecular cloning of a gene responsible for the biosynthesis of the lipopeptide antibiotics iturin and surfactin. *J Ferment Bioeng* 74:323-326
- Huffman JL, Brennan RG, 2002. Prokaryotic transcription regulators: more than just the

helix–turn–helix motif. *Curr Opin Microbiol* 12:98–106

Imanaka T, Fujii M, Aiba S, 1982. Transformation of *Bacillus stearothermophilus* with plasmid DNA and characterization of shuttle vector plasmids between *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus subtilis*, *J of Bacteriol* 149:824–830

Kang JS, Jeon YJ, Kim HM, Han SH, Yang KH, 2002. Inhibition of inducible nitric–oxide synthase expression by silymarin in lipopolysaccharide–stimulated macrophages. *J Pharmacol Exp Ther* 302(1):138–144

Karatas AY, Cetin S, Ozcengiz G, 2003. The effects of insertional mutations in *comQ*, *comP*, *srfA*, *spo0H*, *spo0A* and *abrB* genes on bacilysin biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Biochim Biophys Acta* 1626:51–56

Kowall M, Vater J, Ziessow D, 1998. Separation and Characterization of surfactin isoforms produced by *Bacillus subtilis* OKB 105. *J Colloid Interface Sci* 204:1–8

Kunst F, Rapoport G, 1995. Salt stress is an environmental signal affecting degradative enzyme synthesis in *Bacillus subtilis*, *J Bacteriol* 177:2403–2407

Lazazzera BA, 2000. Quorum sensing and starvation: signals for entry into stationary phase. *Curr Opin in Microbiol* 3:177–182

Lee J, Ryou C, Kwon M, 2001. Molecular cloning and expression of human dihydrolipoamide dehydrogenase–binding protein in *Escherichia coli*. *J Microbiol Biotechnol* 11:592–59

Matsuno Y, Ano T, Shoda M, 1992. High–efficiency transformation of *Bacillus subtilis* NB22, an antifungal antibiotic iturin producer, by electroporation. *J Ferment Bioeng* 73:261–264

McCartney–Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JE, Xie QW, Nathan CF, Wahl SM, 1993. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J Exp Med* 178:749–754

Meng AH, Ling YL, Zhang XP, Zhang JL, 2002. Anti–inflammatory effect of cholecystokinin and its signal transduction mechanism in endotoxic shock rat. *World J*

Gastroenterol 84:712-717

Morita H, Semma M, Hori M, Kitano Y, 1995. Clinical application of nitric oxide synthase inhibitor for atopic dermatitis. *Int J Dermatol* 34(4):294-295

Moyne AL, Cleveland TE, Tuzun S, 2004. Molecular characterization and analysis of the operon encoding the antifungal lipopeptide bacillomycin D. *FEMS Microbiol Letters* 234: 43-49

Murrel GA, Jang D, Williams RJ, 1995. Nitric oxide activates metalloprotease enzymes in articular cartilage. *Biochem Biophys Res Commun* 206:15-21

Nakayama S, Takahashi S, Hirai M, Shoda M, 1997. Isolation of new variants of surfactin by a recombinant *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 48:80-82

Nunokawa Y, Oikawa S, Tanaka S, 1996. Human inducible nitric oxide synthase gene is transcriptionally regulated by nuclear factor- κ B dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 223:347-352

Ohashi Y, Ohshima H, Tsuge K, Itaya M, 2003. Far different levels of gene expression provided by an oriented cloning system in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Letters* 221:125-130

Phillips ZEV, Strauch MA, 2002. *Bacillus subtilis* sporulation and stationary phase gene expression. *Cell Mol Life Sci* 59:392-402

Razafindraambo H, Paquot M, 1993. Purification of antifungal lipopeptides by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatography* 639:81-85

Roongsawang N, Kameyama T, Imanaka T, 2002. Isolation and characterization of a halotolerant *Bacillus subtilis* BBK-1 which produces three kinds of lipopeptides: bacillomycin L, plipastatin, and surfactin. *Extremophiles* 6:499-506

Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J, 1992. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258:1898-1902

Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, Lee SS, 2001. Molecular

mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. *Mutat Res* 480-481:243-268

Symmank H, Franke P, Bernhard F, 2002. Modification of Biologically active peptides: Production of a novel lipohexapeptide after engineering of *Bacillus subtilis* surfactin synthetase. *Protein Eng* 15:913-921

Taskiran D, Stefanovic-Racic M, Georgescu H, Evans C, 1994. Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 200:142-148

Tosato V, Albertini AM, Bruschi CV, 1997. Sequence completion, identification and definition of the fengycin operon in *Bacillus subtilis* 168. *Microbio* 143:3443-3450

Tran LS, Nagai T, Itoh Y, 2000. Divergent structure of the ComQXPA quorum-sensing components: molecular basis of strain-specific communication mechanism in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 37:1159-1171

Tsuge K, Akiyama T, Shoda M, 2001. Cloning, sequencing, and characterization of the Iturin A operon. *J of Bacteriol* 183:6265-6273

Tsuge K, Ano T, Shoda M, 1996. Isolation of a gene essential for biosynthesis of the lipopeptide antibiotics plipastatin B1 and surfactin in *Bacillus subtilis* YB8, *Arch Microbiol*, 165:243-251

Volpona L, Besson F, Lancelin JM, 2000. NMR structure of antibiotics plipastatins A and B from *Bacillus subtilis* inhibitors of phospholipase A2. *FEBS Letters* 485:76-80

Wang LL, Johnson EA, 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by fatty acids and monoglycerides. *Appl Environ Microbiol* 58:624-629